KULTUR EMBRYONALER HÜHNCHEN-RETINA: EIGENSCHAFTEN AUSWACHSENDER NEURITEN UND IHRE WECHSELWIRKUNG MIT DER UMGEBUNG

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

MICHAEL CLAVIEZ

aus Kappeln

1981

81 173

KULTUR EMBRYONALER HÜHNCHEN-RETINA: EIGENSCHAFTEN AUSWACHSENDER NEURITEN UND IHRE WECHSELWIRKUNG MIT DER UMGEBUNG

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

MICHAEL CLAVIEZ

aus Kappeln

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 24. März 1981

Dekan: Prof. Dr. A. Hager

1. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Hausen

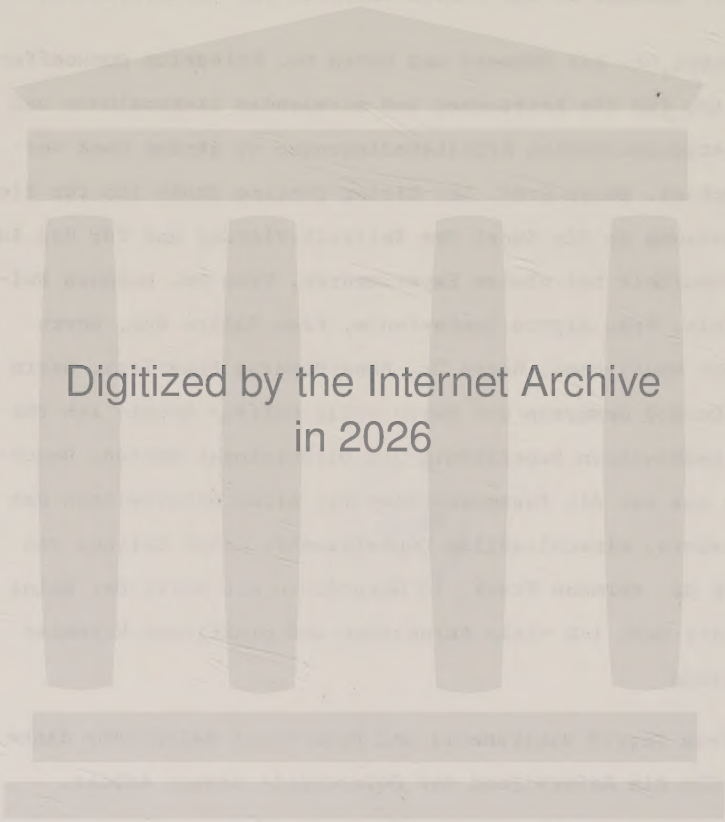
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Seyffert

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Dr. U. Schwarz am Max-Planck-Institut für Virusforschung.

Herrn Dr. Uli Schwarz und Herrn Dr. Friedrich Bonhoeffer bin ich für die kritischen und anregenden Diskussionen und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen zu großem Dank verpflichtet. Herrn Prof. Dr. Dieter Dütting danke ich für die Einweisung in die Kunst der Zellkultivierung und für die Zusammenarbeit bei vielen Experimenten. Frau Dr. Barbara Wallenfels, Frau Sigrid Henke-Fahle, Frau Julita Huf, Herrn Robert Neukirchen, Herrn Dr. Hans-Henning Epperlein, Herrn Dr. Donald Newgreen und Herrn Willi Halfter möchte ich für die gemeinsamen Experimente und Diskussionen danken. Besonders gut war die Zusammenarbeit mit allen Mitarbeitern des EM-Labors, einschließlich Dunkelkammer, unter Leitung von Herrn Dr. Hermann Frank. In Gesprächen mit Herrn Dr. Heinz Schwarz habe ich viele Anregungen und praktische Hinweise erhalten.

Frau Ingrid Baxivanelis und Frau Klara Ralinofsky danke ich für die Anfertigung der Reinschrift dieser Arbeit.


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548922_0080

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	9
1.	Material	9
2.	Methoden	14
2.1.	Herstellung der Kulturen	14
2.1.1.	Explantatkulturen der embryonalen Hühnchenretina	14
2.1.2.	Zellkulturen	16
2.2.	Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien	17
2.3.	Kulturschalen	18
2.3.1.	Vorbehandlung der Kulturschalen durch Beglimmen	18
2.3.2.	Kulturschalen für hochauflösende Lichtmikroskopie	19
2.3.3.	Beschichtung der Kulturschalen mit poly-Aminosäuren	20
2.3.4.	Beschichtung der Kulturschalen mit Kollagen	20
2.4.	Mikromanipulation und Mikroinjektion	23
2.4.1.	Sammeln von Retinafasern	23
2.4.2.	Injektion von Meerrettich-Peroxidase	24
2.5.	Präparationsmethoden für die licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen	25
2.5.1.	Nachweis der Meerrettich-Peroxidase	27
2.5.2.	Fixierung	27
2.5.3.	Einbettung	28
2.5.4.	Herstellung von Schnitten	28
2.5.5.	Kontrastierung	29
2.5.6.	"Kritischer-Punkt"-Trocknung	29
2.6.	Mikroskopie	29
2.6.1.	Lichtmikroskopische Beobachtung, Fotografie und Herstellung von Zeitrafferfilmen	29
2.6.2.	Elektronenmikroskopie	31

Seite

III. ERGEBNISSE 32

1. Kulturbedingungen 32

1.1. Untersuchungen zur optimalen Zusammensetzung des Mediums 32

1.2. Untersuchungen zur Optimierung des Untergrunds für das Auswachsen retinaler Nervenfasern 34

2. Wachstum der Fasern 36

2.1. Entwicklung der embryonalen Hühnchenretina "in vivo" und "in vitro" 37

2.2. Herkunft der Fasern 43

2.3. Morphologie der Faserbündel von Explantatkulturen der embryonalen Hühnchenretina 45

2.3.1. Das Auswachsen von Faserbündeln auf zweidimensionalem Substrat 45

2.3.2. Das Auswachsen von Fasern aus Explantaten der embryonalen Hühnchenretina in Abhängigkeit vom Untergrund 52

2.3.3. Das Auswachsen von Fasern aus Explantaten der embryonalen Hühnchenretina in Abhängigkeit vom Medium 58

2.3.4. Das Überleben von Fasern aus Explantaten der embryonalen Hühnchenretina 61

2.3.5. Retinaexplantate in dreidimensionalem Kollagengeflecht 63

2.4. Axonaler Transport von Meerrettich-Peroxidase: Verlauf von retinalen Fasern in Explantaten des Tektums 66

3. Vergleich der Proteinzusammensetzung von Retinazellen und von isolierten Retinaneuriten 69

4. Orientierung der Fasern 74

4.1. Mechanische Führung von Neuriten 74

4.2. Unterschiede zwischen anterioren und posterioren Retinaneuriten 82

4.3. Versuche zur Chemotaxis 87

		Seite
IV.	DISKUSSION	92
V.	ZUSAMMENFASSUNG	101
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	102

I. EINLEITUNG

Das zentrale Nervensystem der Wirbeltiere ist ein kompliziertes Gebilde aus Milliarden von Nervenzellen. Beim Menschen wird die Zahl auf 10^{11} bis 10^{12} Neuronen geschätzt, die jeweils Information von durchschnittlich 1 000 anderen Zellen empfangen und sie auf ebenso viele Partner übertragen. Gliazellen stützen und ernähren sie; auch ihre Zahl ist groß. Aus elektrophysiologischen und histologischen Untersuchungen weiß man, daß die Nervenzellen in hochspezifischer Weise in Schaltkreisen miteinander verknüpft sind; vom Verstehen dieses Systems sind wir weit entfernt.

Die enormen Leistungen und das noch weitgehend unbekannte Zustandekommen der dreidimensionalen Struktur des zentralen Nervensystems machen die Beschäftigung damit besonders reizvoll. Uns interessiert dabei vor allem die Frage nach der Entstehung des neuronalen Netzwerks während der Embryogenese. Eine der damit zusammenhängenden, grundlegenden Fragen ist, wie die Nervenfasern den Weg zu ihren teilweise weit entfernten Zielorten finden. Dieses Problem ist besonders intensiv am optischen System niederer Wirbeltiere untersucht.

Bei Fischen, Amphibien und Vögeln wird die Abbildung der Umwelt von der Retina auf das Mittelhirndach oder optische Tektum übertragen (retinotope Projektion). Der von den Photorezeptorzellen aufgenommene Lichtreiz wird über verschiedene Nervenzellen (Horizontal-, Bipolar- und Amakrinzellen) an die Ganglionzellen weitergegeben, deren Axone die Retina als optischer Nerv verlassen. Nach vollständiger Überkreuzung im Chiasma erreichen die Fasern das optische Tektum als erste

Verschaltungsstelle im Gehirn. Werden auf der Retina benachbarte Stellen gereizt, können Signale von ebenfalls benachbarten Gebieten des optischen Tektums abgeleitet werden (Clarke, 1976). Korrespondierende Orte können auch ermittelt werden, wenn die Retina örtlich verletzt und der Verlauf der als Folge der Verletzung degenerierenden Fasern verfolgt wird (McGill, 1966). Der Faserverlauf kann auch durch Injektion von Substanzen sichtbar gemacht werden, die von der Retina anterograd zum optischen Tektum (Fujisawa, 1981) und retrograd in umgekehrter Richtung (LaVail, 1974) von den Ganglionzellaxonen transportiert werden. So läßt sich rekonstruieren, wie die Retina auf dem optischen Tektum abgebildet wird: Die nasale Retina ist am caudalen Tektum und die temporale am rostralen repräsentiert; die dorsalen Fasern der Retina laufen zum ventralen Teil des Tektums und die ventralen zum dorsalen.

Wie finden nun während der Entwicklung des Organismus die optischen Axone den Weg in ihr Zielgebiet? Zu dieser Frage gibt es eine Reihe von Modellvorstellungen und Hypothesen, von denen bis heute noch keine bewiesen werden konnte.

Eine wichtige Theorie besagt, daß auswachsende Fasern sich an mechanischen Strukturen ausrichten; sie geht auf Beobachtungen von His (1894), Harrison (1911, 1912), Ramón y Cajal (1910, 1928) und Weiss (1929, 1941) zurück, die an Fasern in Kultur gemacht wurden. Dieses Phänomen wurde von Loeb (1902) als Stereotropismus und später von Weiss (1941) als Kontaktführung bezeichnet, was bis heute von vielen Wissenschaftlern als wichtigster, wegbestimmender Mechanismus angesehen wird; er liegt vielen Hypothesen über die Bahnfindung zugrunde. Dem

gegenüber steht eine Theorie, nach der ausschließlich chemische Faktoren den Weg von Fasern beeinflussen. Auf einen solchen sogenannten Neurotropismus oder Chemotropismus schlossen Forssman (1898, 1900) und Ramón y Cajal (1910, 1928) aus der Tatsache, daß bei der Regeneration von peripheren Nerven die Fasern eines proximalen Nervenstumpfes bevorzugt in den distalen Nervenstumpf einwuchsen. Angenommen wurde, daß vom distalen Ende der Nerven eine "anlockende" Substanz abgegeben wird, deren Existenz aber bis heute nicht nachgewiesen werden konnte. Dennoch ist auch diese Theorie noch Grundlage vieler Hypothesen der Bahnfindung von auswachsenden Nervenfasern.

Seit über dreißig Jahren dominiert in der Neurobiologie die von Sperry (1950, 1963) formulierte Chemoaffinitätstheorie der neuronalen Spezifität. Hiernach erhalten die Nervenzellen eine ihrer Position entsprechende, chemische Markierung, die es ihnen ermöglicht, eine komplementäre (oder gleiche) Markierung auf den Zielzellen zu erkennen. Erst vor kurzem war diese Theorie Gegenstand einer Kontroverse zwischen Rager (1980a), der sie für nicht nachprüfbar hält, und Willshaw (1980), der sie verteidigte.

Horder (1978) und Rager (1980b) vertreten die Meinung, daß die retinotope Organisation der Fasern im optischen Nerven bewirkt, daß die Fasern bereits geordnet das Zielgebiet erreichen und daß dort eine unspezifische Interaktion mit den Zielzellen ausreiche, um das Abbildungsmuster zu erklären. Scholes (1979) konnte eine retinotope Anordnung der Fasern im optischen Nerven von Fischen (Cichliden) nachweisen. Auch bei Amphibien gibt es eine gewisse Aussortierung der op-

tischen Fasern vor Erreichen des Tektums: Fasern für den dorso-medialen Teil des Tektums wachsen vorsortiert über den medialen Arm des optischen Trakts ein,und die für den ventro-lateralen Teil des Tektums bestimmten Axone wachsen über einen lateralen Ast in das Zielgebiet (Jacobson, 1960; Arora und Sperry, 1962; Attardi und Sperry, 1963; Scalia, 1974; Fujisawa, 1981).

Gegen eine strikte retinotope Organisation im optischen Nerven sprechen die Beobachtungen von Horton (1979) bei der adulten Katze und Fawcett (1980) beim Frosch (Xenopus laevis), die den Verlauf einzelner, mit Meerrettichperoxidase markierter Fasern verfolgten: in der Retina und am Anfang des optischen Nerven benachbarte Fasern blieben im weiteren Verlauf nicht zusammen. Die in einigen Fällen nachgewiesene, retinotope Organisation der Axone im optischen Nerven scheint also nicht im ganzen Tierreich verwirklicht zu sein.

Es gibt zwei prinzipiell verschiedene Möglichkeiten, den Mechanismus der Wegfindung von Nervenfasern zu untersuchen: Versuche am Tier und in der Kulturschale. Im Folgenden sind einige Experimente zunächst in vivo, dann in vitro aufgeführt, die teilweise den oben erwähnten Modellvorstellungen zugrundeliegen, sie unterstützen oder abschwächen.

Sperry (1943, 1944) untersuchte das Verhalten von Fröschen, nachdem er diesen Augen entnommen und um 180° verdreht wieder implantiert hatte. Nach einigen Wochen war der bei der Operation durchtrennte optische Nerv regeneriert, der Frosch konnte wieder sehen. Aus dem Fangverhalten der Tiere wurde geschlossen, daß die regenerierenden Fasern mit den Teilen des Tektums Verbindung aufnahmen, mit denen sie ursprünglich verknüpft

waren. Dies gilt auch für die an adulten Fröschen (Levine und Jacobson, 1974; Jacobson und Levine, 1975) und adulten Fischen (Sharma und Gaze, 1971; Yoon, 1977) durchgeführten Experimente, bei denen Teile des optischen Tektums herausgeschnitten, gedreht oder auf einen anderen Teil des Tektums übertragen wurden: als Ziel der retinalen Fasern behielten die Tektumstücke jeweils die ihrer ursprünglichen Position entsprechenden Eigenschaften (positional markers: Levine und Jacobson, 1974). Dieses Ergebnis ist jedoch nur für den untersuchten Zeitraum von einigen Wochen gültig. Bei Versuchen am adulten Goldfisch (Gaze und Sharma, 1970; Yoon, 1971; Horder, 1971; Yoon, 1972), bei denen Teile entweder der Retina oder des Tektums entfernt wurden, nahmen einige Monate später die Fasern der reduzierten Retina die gesamte Oberfläche des Tektums ein bzw. war die Retina auf dem verkleinerten Tektum vollständig repräsentiert: der Größenunterschied der Projektionsflächen wurde entweder durch Kompression oder Expansion der retinotopen Projektion ausgeglichen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden (Sharma, 1972 ; Cook und Horder, 1974; Cook, 1979), daß die retinalen Fasern einige Wochen nach der Operation zunächst ihre korrekten Zielgebiete innervierten, um später ihr Verknüpfungsmuster so zu ändern, daß alle regenerierenden Fasern Platz fanden (Kompetition der retinalen Fasern um tektale Zielgebiete). Diese Plastizität der Verknüpfungen ist nur bei Fischen so ausgeprägt, bei denen Augen und Tekta das ganze Leben lang wachsen. Die Phänomene der Kompression und Expansion verlaufen beim Frosch sehr viel langsamer und nur nach Schneiden des optischen Nervs (Udin, 1975, 1976). Beim Huhn dagegen findet eine Expansion der retinotopen Projektion nur sehr früh in der Entwicklung

statt, bevor die ersten Ganglionzellen postmitotisch werden (vor Stadium 11/12 nach Hamburger und Hamilton, 1951; Crossland, 1974).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die bisherigen Ergebnisse an verschiedenen Tierspezies keine allgemeingültige Erklärung für den Mechanismus liefern, nach dem die retinotope Projektion während der Entwicklung zustandekommt; vielleicht gibt es dafür auch gar keine generell gültige Erklärung.

Bisher wurden Versuche am Tier beschrieben. Eine andere Möglichkeit, die Wechselwirkungen zwischen Nervenfasern und ihrem Zielgewebe zu studieren, sind Untersuchungen an isolierten Systemen in vitro.

Eine einfache Erklärung für Spezifität wäre eine differentielle, interzelluläre Affinität zwischen Zellen. Affinitäten zwischen Zellen können "in vitro" gemessen werden, indem zum Beispiel Einzelzellen eines Gewebstyps (oder von einer Region eines Gewebes) in Kontakt gebracht werden mit Gewebe oder Zellen eines anderen Typs und die Adhäsion verfolgt wird. So wurde gefunden, daß Zellen der dorsalen Retina bevorzugt an ventrale Tektumhälften (Barbera, 1973, 1975) und an Zellrasen aus ventralen Tektumzellen (Gottlieb und Arington, 1978) anhafteten und Zellen der ventralen Retina bevorzugt an dorsale Tektumhälften und an Zellrasen aus dorsalen Tektumzellen. Auch ist die Affinität von Einzelzellen der dorsalen Retina zu Zellrasen aus ventralen Retinazellen größer als zu Zellrasen aus dorsalen Retinazellen und umgekehrt (Gottlieb, 1976). Das führt zur einfachsten Version des retino-tektalen Adhäsions-Modells: auf Retina und Tektum sind

die gleichen zwei Liganden in komplementären Gradienten angeordnet, die nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip miteinander reagieren (Marchase, 1975). Diese Beobachtungen unterstützen Sperry's Chemoaffinitätstheorie, wenn tatsächlich alle retinalen Zellen die gleichen Positionsmarker tragen und nicht nur die Ganglionzellen, die weniger als 10 % der Retina ausmachen. Außerdem ist noch nicht bewiesen, daß die beobachtete Zelladhäsion wirklich dazu dient, die retino-tektale Projektion im Organismus zu etablieren (Review über Zellerkennung: Frazier und Glaser, 1979). Doch bieten diese Versuche Ansatzpunkte für weitere biochemische Untersuchungen, in denen nach spezifischen Bindungsmolekülen gesucht wird, die für die neuronale Spezifität verantwortlich sind (Hausmann und Moscona, 1976: Retinaspezifischer Aggregationsfaktor; Thiery, 1977: Cell Adhesion Molecule).

Im Folgenden werden besonders Versuche beschrieben, bei denen die Wechselwirkungen zwischen in Kultur wachsenden Zellen und Organteilen untersucht werden. Hierbei können lebende Zellen und ihre Fortsätze direkt beobachtet werden. Weiss (1955) und viele andere Autoren beobachteten, daß mechanische Faktoren (Strukturen im Wachstumsuntergrund) die Wachstumsrichtung von Zellen in Kultur beeinflussen können. Letourneau (1975b) beschrieb das Verhalten von auswachsenden Nervenfasern auf unterschiedlichen Substraten und fand große Unterschiede in der Affinität der Fasern zu verschiedenen Wachstumsunterlagen. Schließlich scheint auch die Hypothese des Chemotropismus durch "in vitro"-Versuche von Chamley (1973), Ebendal (1976b) und Ebendal und Jacobson (1976) unterstützt zu werden, die zeigten, daß auswachsende Fasern

zumindest vom peripheren Nervensystem (sympathische Ganglien von Hühnerembryonen) sich auf Stücke ihrer prospektiven Zielorgane ausrichteten. Bonhoeffer (1980) beschrieb Experimente, in denen auswachsende Retinafasern die Wahl zwischen zwei verschiedenen Zellschichten hatten, und zwar entweder Retina- oder Tektumzellen, und er konnte zeigen, daß sie einen Rasen von Tektumzellen bevorzugten.

In der vorliegenden Arbeit werden Kulturbedingungen beschrieben, unter welchen Neuriten aus Explantaten der embryonalen Hühnchen-Retina auswachsen, wobei sie die natürliche Orientierung im Gewebe beibehalten. Die Art des Auswachsens und die Wechselwirkungen der Neuriten (i) untereinander, (ii) mit verschiedenen Wachstumsunterlagen und (iii) mit Tektumstückchen als Zielorgan werden beschrieben.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

Verbrauchsmaterialien und Geräte für die Gewebezüchtung sind in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Materialien von der Firma MERCK, Darmstadt, bezogen.

Antibiotica:

Moronal (Fungizid), VON HEYDEN GmbH, München

Penicillin G Na-/K-Salz, HOECHST AG, Frankfurt

Streptomycin, BAYER, Leverkusen

Desoxyribonuclease:

WORTHINGTON BIOCHEMICAL CO., Freehold, USA

Eagle's Medium (modifiziert):

	Modifikation nach Graf	Dulbecco's Modifikation
	mg/Liter	mg/Liter
Aminosäuren		
L-Alanin	17,8	
L-Arginin:HCl	84	84
L-Asparaginsäure	30	
L-Cystin	48	48
L-Glutamin	585	584
L-Glutaminsäure	75	
Glycin	100	30
L-Histidin	42	

Aminosäuren (fortgesetzt)		
L-Isoleucin		105
DL-Isoleucin	210	
L-Leucin	105	105
L-Lysin:HCl	146	146
L-Methionin		30
DL-Methionin	60	
L-Phenylalanin		66
DL-Phenylalanin	132	
L-Prolin	25	
L-Serin	21	
L-Threonin		95
DL-Threonin	190	
L-Thryptophan	16	16
L-Tyrosin	72,3	72
L-Valin		94
DL-Valin	187	
Vitamine		
Biotin	0,1	
Ca-Pantothenat	4	4
Cholin:HCl	4	4
Folsäure	4	4
i-Inosit	7	7,2
Nicotinamid	4	4
Pyridoxal:HCl	4	4
Riboflavin	0,4	0,4
Thiamin:HCl	4	4

Anorganische Salze

NaCl	6400	6400
KCl	400	400
$CaCl_2$		200
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	265	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	200	200
$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	0,1	0,1
$NaHCO_3$	2400 (=28mM)	3700 (=44mM)
$NaH_2PO_4 \cdot 1H_2O$	125	125

Andere Komponenten

Glucose	4500	4500
Hypoxanthin	25	
Phenolrot	10	15
Penicillin	(100000E)	
Streptomycin	100	
HEPES-Puffer	(10mM)	

Embryoextrakt von Huhn und Rind:

GIBCO BIOCULT, Glasgow, Scotland

Gewebekulturschalen (verschiedener Größen):

COSTAR, Cambridge, Mass., USA

FALCON, vertreten durch BECTON, DICKINSON & CO., Heidelberg

FLOW LABORATORIES, Bonn

HERAEUS GmbH, Hanau

LINBRO, vertreten durch FLOW LABORATORIES

LUX, Thousand Oaks, California, USA

Gewebezerhacker:

McIlwains Tissue Chopper, Lieferant: BACHOFER GmbH, Reutlingen

Isotopenmarkierte Chemikalien:

L-^{35}S-Methionin, spezifische Aktivität 159,93 Ci/mmol; Konzentration 1 mCi in 0,21 ml, NEW ENGLAND NUCLEAR CHEMICALS GmbH, Frankfurt.

Meerrettichperoxidase (EC 1.11.1.7.) Type VI:

Reinheitszahl 3 (RZ = OD 403 nm/275 nm), SIGMA GmbH, München.

Meerrettich-Peroxidase-Nachweis:

Benzidindihydrochlorid, SERVA FEINBIOCHEMICA GmbH, Heidelberg
Diaminobenzidin, SIGMA GmbH, München
Hanker-Yates-Reagent, POLYSCIENCE, Warrington,USA.

Membranfilter (für die Kultivierung von Retinastreifen):

Sartorius Membranfilter Typ SM N 13006, SARTORIUS MEMBRANFILTER GmbH, Göttingen

Mikromanipulator:

pneumatisch nach DE FONBRUNE: Gebr. KLEES, Düsseldorf
mechanisch: NARISHIGE SCIENTIFIC INSTRUMENTS LABORATORIES, Tokyo, Japan

Mitosehemmer:

Cytosin-1ß-D-Arabinofuranosid, SIGMA GmbH, München
5-Fluorodeoxiuridine, SIGMA GmbH, München
Mitomycin C, SIGMA GmbH, München

Poly-Aminosäuren zur Beschichtung von Gewebekulturschalen:

p-Lysin MG 85 000, SIGMA GmbH, München
p-Ornithin MG 122 000, SIGMA GmbH, München

Puffer-Lösungen

Hank's Salzlösung (ohne Ca^{++} und Mg^{++}):

	g/Liter
NaCl	8,0
KCl	0,4
KH_2PO_4	0,06
$Na_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0,06
Glucose	1,0
$NaHCO_3$	0,35
HEPES-Puffer	(20mM)
Phenolrot	0,01

mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS):

	g/Liter
NaCl	8,0
KCl	0,2
KH_2PO_4	0,2
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	1,15
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,1

Rasierklingenbrecher (= -halter):

INOX BA 290, AESKULAP, Tuttlingen

Sera

Fetal Calf Serum — Newborn Calf Serum

Horse Serum — Rat Serum

Human Placenta Serum

Mouse Serum — alle von GIBCO, Glasgow, Scotland

Trasylol:

(20 000 KIE (= Kallikrein Inhibierende Einheiten) pro Milliliter, entspricht ca. 22 Trypsin Inhibierenden Einheiten), BAYER, Leverkusen

Trypsin:

Bovine pankreas trypsin 2x crystallized, salt free, WORTHINGTON BIOCHEMICAL CO., Freehold, USA.

2. Methoden

2.1. Herstellung der Kulturen

2.1.1. Explantatkulturen der embryonalen Hühnchenretina:

Befruchtete Hühnereier (mit der Bezeichnung "HISEX"-Bruteier weiß) wurden bei Raumtemperatur nicht länger als fünf Tage aufbewahrt, bis sie in einem Inkubator eingelegt wurden, in dem sie bei 37,8°C und 75% Luftfeuchtigkeit alle sechs Stunden automatisch gewendet wurden. Aus 5, 6 und 7 Tage alten Hühnerembryonen wurden die Augen entnommen und die Sclera und das Pigmentepithel mit zwei spitzen Pinzetten entfernt. Dann wurde der Glaskörper festgehalten und die Retina vorsichtig abgestreift. Danach wurde die Retina entweder direkt mit dem Gewebezerhacker (McIlwain, 1953) in Quadrate von 300 - 500 µm Kantenlänge zerteilt, oder zunächst auf einem schwarzen Membranfilter (II. 1.) ausgebreitet, am Rand mit der Pinzette festgedrückt, überschüssige Flüssigkeit abgesaugt und wiederum mit dem Gewebezerhacker in 300 µm breite Streifen durch die ganze Retina geschnitten. Die Präparation erfolgte in Hank's Salzlösung

ohne Ca^{++} und Mg^{++} (II. 1.), dem 4 KIE Trasylol (II. 1.) pro Milliliter zugegeben waren (die gebräuchliche Konzentration ist 2 KIE), um durch Verletzung der Zellen freigesetzte Proteasen zu inaktivieren.

Die Retinastückchen wurden mit einer Glaskapillare mit Mundschlauch und die Streifen mit einer Pinzette in eine zur Äquilibrierung im CO_2-Brutschrank vorinkubierte Kulturschale übertragen und ungefähr drei Stunden in so wenig Kulturmedium (im Brutschrank) belassen, daß sie durch die Oberflächenspannung des Mediums auf die Wachstumsunterlage gedrückt wurden, aber nicht eintrockneten. Dann wurde vorsichtig Medium dazugegeben, ohne viel Turbulenz zu erzeugen, damit sich die Explantate nicht wieder von der Unterlage lösten. Die Kulturen wurden in der Regel in einem Brutschrank mit hoher Luftfeuchtigkeit bei 37°C und 4 % CO_2 inkubiert. Dabei stellt sich das entsprechend gepufferte Medium (siehe Kapitel II. 1.: Eagle's Medium (modifiziert)) auf einen pH von 7,2 - 7,4 ein.

Ist eine Kulturschale längere Zeit der Normalatmosphäre ausgesetzt, so wird das Medium zu alkalisch, was man am Farbumschlag des Phenolrot von organgerot nach violett erkennen kann. Um dem zu begegnen wurde bei einigen Versuchen, wie z.B. bei Meerrettichperoxidase-Injektionen (siehe Kapitel III.2.4.), Sammeln von Neuritenteilen (siehe Kapitel III. 3) oder Zeitrafferaufnahmen ohne spezielle Klimakammer, das Standardmedium durch stärker gepuffertes HEPES-Standardmedium ersetzt (siehe II. 3.). Darin wachsen die Zellen ohne zusätzliches CO_2 in der Atmosphäre mindestens einen Tag lang ebenso gut weiter wie im Standardmedium im CO_2-Brutschrank.

2.1.2. Herstellung von Zellkulturen: Für die Kultivierung von Gliazellen des optischen Nerven der Ratte, die einen Zellrasen als Substrat für Retinaexplantate ausbilden sollten, und von Zellen verschiedener Teile des Gehirns von Hühnerembryonen, die das Medium mit wachstumsfördernden Faktoren anreichern sollten (Konditionierung des Mediums), mußten die Gewebeteile zunächst in Einzelzellen zerlegt werden. Dies wurde nach einer Abwandlung der Methode von Porzig (1978) durchgeführt: ca. 30 isolierte optische Nerven von neugeborenen Rattenembryonen bzw. Gehirnabschnitte (Vorder-, Mittel-, Hinterhirn, optisches Tektum) von 4 Hühnerembryonen (10 Tage alt) wurden 30 Minuten bei 37°C in HEPES-Basismedium (ohne Ca^{++} und Mg^{++}, + 10 % Hühnerserum) mit 1 % Trypsin inkubiert, dreimal in normalem HEPES-Basismedium (+ 10 % Hühnerserum) mit 0,2 mg/ml Trypsininhibitor gewaschen, dann nochmals gewaschen in Medium ohne Trypsininhibitor, aber mit Zusatz von DNase (ca. 25 µg/ml). Darauf wurde das Gewebe ca. sechsmal langsam mit einer durch Anschmelzen eingeengten Pasteurpipette (ø ca. 0,2 mm) aufgesaugt und wieder ausgeblasen. Die so entstandene Einzelzellsuspension wurde in einer gekühlten Zentrifuge bei 50 x g fünf bis sieben Minuten zentrifugiert, in Standardmedium (siehe Kapitel II. 3.) ohne Embryoextrakt aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und mit Medium auf eine Endkonzentration von 10^5 Zellen/ml (Zellen aus dem optischen Nerven) bzw. 2 x 10^6 Zellen/ml (andere Gewebe) gebracht. Die Zellen wurden auf vorinkubierte, z.T. mit Kollagen beschichteten Gewebekulturschalen (II. 2.3.4.) ausgesät; das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt.

Nach ungefähr 4 Tagen hatten die Gliazellen aus dem optischen Nerven einen konfluenten Zellrasen ausgebildet. Dann wurde die

weitere Vermehrung der Zellen durch Zugabe von 10^{-5} M 5-Fluordesoxy-Uridin, Mitomycin C oder Cytosin-Arabinosid (Mithosehemmer, II. 1.) verhindert (wobei Cytosin-Arabinosid am wirkungsvollsten war) und die Schale bis zur Verwendung mit Standardmedium im Brutschrank weiter inkubiert.

2.2. Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien

Als Kulturmedium wurde ein modifiziertes Eagle's Medium verwendet, dem hauptsächlich die Zusammensetzung des "Dulbecco's modified Eagle's medium" (DMEM; Dulbecco, 1959) zugrundeliegt, das aber im Laufe der Jahre im Max-Planck-Institut für Virusforschung, vor allem durch Thomas Graf (persönliche Mitteilung), Veränderungen erfahren hat. Daher ist in Kapitel II. 1. unter Eagle's Medium (modifiziert) die Zusammensetzung der Modifikation nach Graf der Dulbecco's Modifikation gegenübergestellt.

Zur Herstellung des Mediums werden zunächst eine Reihe von Stammlösungen angesetzt, die in einer bestimmten Reihenfolge erst unmittelbar vor Gebrauch zusammengemischt werden (beschrieben z.B. in John Paul: Zell- und Gewebekulturen (1980)).

Als Ausgangsmedium diente das in II. 1. aufgelistete, nach Graf modifizierte Eagle's Medium, jedoch ohne die Puffersubstanzen $NaHCO_3$ und HEPES, das in 250 ml-Portionen eingefroren ($-20^{o}C$) gelagert wurde. Durch Zugabe von 0,24 % $NaHCO_3$ (=28 mM) und 5 mM HEPES entstand das Basismedium für den CO_2-Brutschrank. Für die Kultivierung in Normalatmosphäre wurde das Basismedium mit 0,05 % $NaHCO_3$ (= 6 mM) und 20 mM HEPES gepuffert und mit 5 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt (HEPES-Basismedium). Das Basismedium wurde zum Standardmedium (oder HEPES-Standardmedium) durch

folgende Bestandteile vervollständigt:

Serum von fötalen Kälbern	10 %
Serum von Huhn (oder Ratte)	2 %
Embryoextrakt (Huhn oder Rind)	1 %
L-Glutamin	2 mM

Zur Herstellung von konditioniertem Medium wurden die in II. 2.1.2. beschriebenen Primärkulturen verwendet. Nach 2 Tagen Inkubation wurde der Überstand der Kulturen gesammelt und bis zur Benutzung nicht länger als eine Woche im Kühlschrank aufbewahrt. Dieses konditionierte Medium wurde entweder unverdünnt oder 1:1 mit frischem Medium versetzt verwendet.

2.3. Kulturschalen

Die verwendeten Plastik-Gewebekulturschalen sind in Kapitel II. 1. aufgeführt. Am häufigsten wurden die 35 x 10 mm Schalen von FALCON und die "Petriperm"-Schalen (hydrophile Seite der Biofolie nach innen!) von HERAEUS benutzt.

2.3.1. Vorbehandlung der Kulturschalen durch Beglimmen:

Sowohl vor dem Aussäen von Zellen bzw. Auspflanzen von Gewebestückchen als auch vor der Beschichtung mit poly-Aminosäuren oder Kollagen (s.u.) wurde der Schalenboden in der Regel einer Wechsel-Hochspannungsglimmentladung (Beglimmung) ausgesetzt. Diese Prozedur ist eine in der Elektronenmikroskopie gebräuchliche Methode, um Oberflächen von Trägerfilmen (z.B. aufgedampfte Kohleschichten) hydrophil zu machen; die Bedampfungsgeräte der meisten Hersteller sind zum Beglimmen geeignet. Den Arbeiten von Dubochet (1971) und Reissig (1970) kann man entnehmen, wie eine solche Ionisationskammer selbst gebaut werden kann.

Die Beglimmung wurde in einer Edwards-Bedampfungsanlage E 12 E durchgeführt, in der sich zwei ringförmige Elektroden (Elektrodendurchmesser 8 mm, Ringdurchmesser 16,5 cm) in einem Abstand von 1,9 cm (= lichte Weite) befinden. Während der Glimmentladung bei einem Vakuum von 0,1 Torr fließt ein Strom von 0,4 Ampere. Der einzige Unterschied bei der Beglimmung von Schalen gegenüber der Beglimmung von Trägerfilmen für die Elektronenmikroskopie besteht darin, daß das Schutzschild, das normalerweise den direkten "Sicht"-Kontakt zwischen Elektroden und Objekt verhindert, entfernt wird.

Um die Schalen nach der Beglimmung steril aus den Rezipienten entnehmen zu können, befanden sie sich in einem weiteren Gefäß, dessen Deckel unter Vakuum (mit Hilfe einer Vakuumdrehdurchführung) gehoben und gesenkt werden konnte.

2.3.2. Herstellung von Kulturschalen für hochauflösende Lichtmikroskopie: Hochauflösende Lichtmikroskopie und Betrachtung im Differential-Interferenz-Kontrast ist durch die ca. 1 mm dicken Schalenböden (und -deckel) nicht möglich, da einerseits der Abstand zwischen Objekt und Objektiv zu groß ist und andererseits das Plastikmaterial unerwünschte polarisierende Eigenschaften besitzt. Um diese Nachteile zu umgehen, wurden in verschiedenen Schalen ungefähr die Hälfte der Fläche von Boden und Deckel ausgestanzt und über die Löcher mit einem Epoxid-Harz (Epon, Einbettmittel für die Elektronmikroskopie, siehe Kapitel II. 2.5.3.) Deckgläser geklebt (Deitch, 1966). Dieser neue Schalenboden wurde ebenso wie die Plastikschalen nach den in den folgenden Kapiteln beschriebenen Methoden beschichtet.

2.3.3. Beschichtung der Kulturschalen mit poly-Aminosäuren: Die Beschichtung des Schalenbodens von Plastik-Gewebekulturschalen erfolgte weitgehend nach der Beschreibung von Letourneau (1975a). Man läßt eine 0,1 %ige poly-Ornithin- bzw. poly-Lysin-Lösung in 0,15 M Boratpuffer (pH 8,4) 24 Stunden bei Raumtemperatur auf die durch Beglimmung (II. 2.3.1.) gereinigte Flächen einwirken. Dann werden die Schalen mit destilliertem Wasser gewaschen und eine Woche (3mal Wasserwechsel) bei 4°C gewässert. Das Wasser wird abgegossen, die Schalen werden dann unter einer UV-Lampe sterilisiert (2-3 Stunden) und trocken aufbewahrt.Vor der Verwendung werden die Schalen mit Ca^{++}- und Mg^{++}-freiem, Na-Bicarbonat-haltigem Basismedium (II. 2.2.) gewaschen und im CO_2-Brutschrank vorinkubiert.

2.3.4. Beschichtung der Kulturschalen mit Kollagen: Rattenschwanz-Kollagen wurde in Anlehnung an die von Bornstein (1958) und Elsdale (1972) beschriebenen Methoden gewonnen. Tiefgefrorene Rattenschwänze wurden zunächst ca. 10 Minuten in 95 % Alkohol eingeweicht. Dann wurden sie sukzessive vom Schwanzende her in ca. 2 cm lange Stücke gebrochen und auseinandergezogen; die dabei freigelegten, silbrigen Sehnenstränge wurden abgeschnitten und in sterilem, destilliertem Wasser gesammelt. Material von vier Schwänzen wurde mit Pinzetten in feinere Stränge aufgetrennt und in 300 ml verdünnter Essigsäure (1 : 1000) bei 4°C zwei Tage stehengelassen. Die Kollagenlösung wurde 2mal 12 Stunden gegen je zwei Liter 1:10 verdünntes Ausgangsmedium (= Medium ohne Puffersubstanzen, siehe Kapitel II. 2.2.) bei 4°C dialysiert, dessen pH mit Salzsäure auf einen Wert von 4 eingestellt worden war. Die dialysierte Lösung wurde 24 Stunden in einer gekühlten Zentrifuge bei 17 000 U/min (entspricht

25 200 x g, bezogen auf den mittleren Radius von 7,8 cm) zentrifugiert, vorsichtig dekantiert und bei 4°C bis zu einem Jahr aufbewahrt.

Die Beschichtung der Schalenböden mit Kollagen erfolgte nach folgenden drei Methoden:

a) Denaturierte Kollagenschicht

Man verteilte einige Tropfen der Kollagenlösung auf dem Schalenboden und ließ sie an der Luft oder in Ammoniakatmosphäre eintrocknen und stellte die Schalen ca. zwei Stunden unter eine UV-Lampe. Die Schalen wurden mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Wasser bei 4°C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde das Wasser durch Basismedium (II. 2.2.) ersetzt und im CO_2-Brutschrank vorinkubiert.

b) Dreidimensionales Kollagengeflecht

Auf Eis wurden folgende Stammlösungen vorbereitet und in der Reihenfolge A-D in den angegebenen Verhältnissen gemischt:

A	alle Serumbestandteile des Standardmediums (II. 2.2.) in den entsprechenden Proportionen	16,2
B	10fach konzentriertes Ausgangsmedium gepuffert mit 9 mM $NaHCO_3$ und 15 mM HEPES	10,8
C	0,142 N NaOH	9
D	Kollagenlösung pH 4	64
		100

Die Lösungen dürfen erst unmittelbar vor Gebrauch vermischt werden, da die Polymerisation des Kollagens rasch einsetzt. Als zusätzliche Maßnahmen, um ein zu schnelles Ausflocken zu verhindern, wurde Lösung B durch Einblasen von CO_2-Gas angesäuert,

Pipetten wurden vorgekühlt. Die Mischung wurde in die Kulturschalen gegeben und im CO_2-Brutschrank inkubiert. Die Explantate wurden entweder sofort in die noch flüssige Mischung eingesetzt oder später auf das Kollagen aufgelegt. Das so hergestellte Kollagen besteht aus einem lockeren Geflecht von ca. 20 bis 100 nm dicken Fibrillen (siehe z.B. Abb. 8, 22, 25), die im Elektronenmikroskop eine ähnliche laterale Periodizität wie in vivo aufweisen (Abb.1) (Elsdale, 1972). Dieses Kollagen wird im Text als fibrilläres Kollagen bezeichnet.

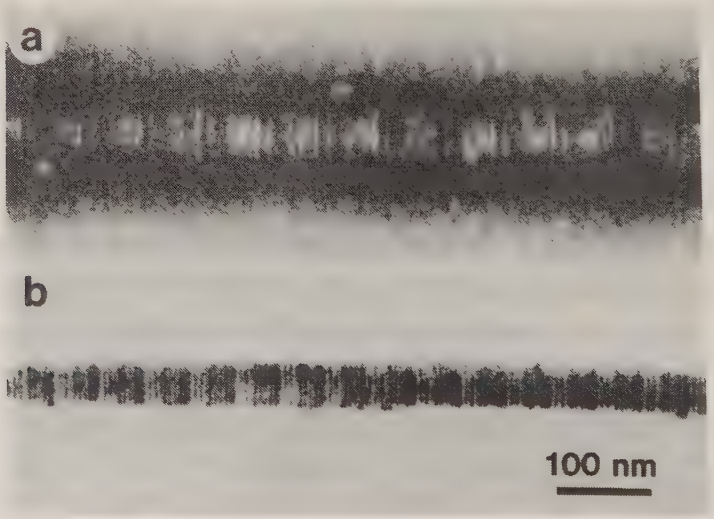


Abb.1 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Kollagenfibrillen: a) nach Negativ-Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure, pH 7.2 b) im Ultradünnschnitt

c) Zweidimensionales, gerichtetes Kollagengeflecht

Die in Abschnitt b) beschriebene Kollagenmischung wurde auf dem Boden von beglimmten (II. 2.3.1) und vorgekühlten Schalen verteilt. Dann stellte man die Schalen hochkant auf, damit überschüssiges Kollagen ablaufen konnte, und ließ sie 15 min im CO_2-Brutschrank. Das unten am Schalenrand angesammelte Kollagen

wurde abgesaugt, die Schalen wurden mit Medium gefüllt und zur weiteren Verwendung im CO_2-Brutschrank inkubiert.

2.4. Mikromanipulation und Mikroinjektion

2.4.1. Sammeln von Retinafasern: Um die Proteinzusammensetzung der retinalen Faserenden mit der von Retinagewebe ohne Fasern vergleichen zu können (siehe Kapitel III. 3.), mußte eine ausreichende Menge an Fasermaterial gesammelt werden. Dafür waren zwei 35 x 10 mm FALCON-Gewebekulturschalen nach der in Kapitel II. 2.3.4.c) beschriebenen Methode beschichtet und mit je neun Explantaten (0,4 x 0,4 mm) von der Retina eines sechs Tage alten Hühnerembryos zwei Tage lang in Standardmedium (II. 2.2.) kultiviert worden. Nach dem Waschen mit Methionin-freiem Medium wurden die Schalen in ^{35}S-Methionin-haltigem (0,1 mCi pro ml und Schale) Medium zwei Stunden lang inkubiert. Für die anschließende Präparation wurde zur Aufrechterhaltung des pH in der Normalatmosphäre HEPES-Medium (II. 2.2.) verwandt, das zusätzlich zur Verhinderung von proteolytischen Vorgängen 4 KIE Trasylol (II. 1.) enthielt.

Das Isolieren des Materials wurde unter lichtmikroskopischer Kontrolle durchgeführt. Bewährt hat sich hierfür ein altes, invers aufgebautes LEITZ "Chemiker"-Mikroskop. Die Beobachtung erfolgte entweder mit einem LEITZ Objektiv 4x/- mit enger Kondensorblende (Kontrasterhöhung) oder mit einem ZEISS Objektiv 10x/0,25 Phako und einer provisorisch befestigten ZEISS Phasenplatte Ph 1.

Die Neuriten wurden kurz hinter der Wachstumsfront, an der sich die meisten Wachstumskegel befanden, mit einem Rasierklingensplitter in einem dafür vorgesehen Halter (II. 1.) abgeschnitten.

Mit einer sehr fein ausgezogenen Glaskapillare wurde das abgetrennte Material zu Klümpchen zusammengeschoben und mit Hilfe einer Kapillare mit Mundschlauch in eine Sammelkapillare übertragen.

Die Mikromanipulation wurde anfänglich mit einem pneumatischen Mikromanipulator (II. 1.) bewerkstelligt, später aber mit freier (ausgeruhter!) Hand ausgeführt, wodurch die Präparationsdauer erheblich verkürzt werden konnte.

Zur Messung der Aufnahme von ^{35}S-Methionin in die Zellen und seines Einbaus in Proteine (siehe Kapitel III. 3.) wurden die Explantate nach der zweistündigen Inkubation in ^{35}S-Methionin-haltigem Medium in PBS gewaschen und in 0,2 ml Hank's Salzlösung mit 1 mg/ml Trypsin 1 - 2 Stunden inkubiert. Dann wurden 50 µl 50 % Trichloressigsäure dazugegeben, geschüttelt und bei 100 000 x g zentrifugiert; 100 µl des Überstandes wurden mit 165 µl 0,142 N NaOH und 2 ml Triton-Toluol Szintillator (10 g 2,5-Diphenyloxozol in 1 l Toluol und 0,5 l Triton X-100) versetzt und die Radioaktivität im ^{14}C-Kanal eines Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometers gezählt. Ebenso wurde das Sediment nach Waschen und Aufnahme in Wasser behandelt.

2.4.2. Injektion von Meerrettich-Peroxidase: Die Injektion von 10 - 30 % Meerrettich-Peroxidase, gelöst entweder in destilliertem Wasser oder in Medium, erfolgte unter der in Kapitel II. 4.1. beschriebenen, lichtmikroskopischen Kontrolle mit Hilfe eines pneumatischen und eines mechanischen Mikromanipulators (II. 1.). Der pneumatische Mikromanipulator war von Vorteil, wenn an vielen Orten kurzzeitig Injektionen vorgenommen werden sollten. Bei längeren Injektionen an einem Ort aber machte sich eine Abdrift nachteilig bemerkbar; in solchen Fällen wurde ein mechanischer

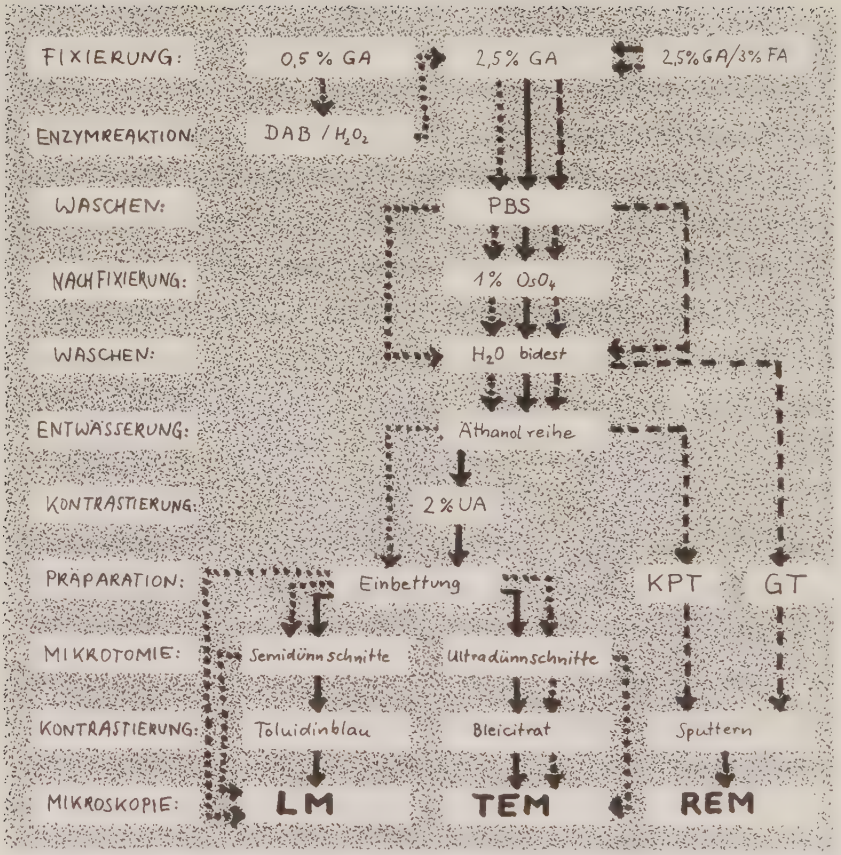
Mikromanipulator verwendet.

Für die Injektionen wurden Glaskapillaren mit Innenfilament benutzt, die maschinell ausgezogen und ca. 1 mm hinter der Spitze abgebrochen wurden, sodaß ihre Öffnungen einen Durchmesser von ungefähr 50 bis 100 µm hatten. Sehr dünne Kapillaren wurden von hinten gefüllt, indem sie mit der Spitze nach oben in ein Gefäß mit Meerrettich-Peroxidase-Lösung gestellt wurden. Unmittelbar vor Gebrauch mußte die äußerste Spitze abgebrochen werden, da entweder eine Luftblase oder auskristallisierte Meerrettich-Peroxidase den Austritt der Injektionslösung verhinderte. Kapillaren mit weiteren Öffnungen wurden mit mäßigem (Gasblasen!) Wasserstrahlvakuum gefüllt, wobei ihre Spitze in die Meerrettich-Peroxidase-Lösung eintauchte.

Die Applikaton der Meerrettich-Peroxidase erfolgte entweder durch Druck, wobei die Kapillare über einen luftgefüllten Schlauch mit einer leichtgängigen 10 ml-Glasspritze verbunden war, oder iontophoretisch, wobei die Elektrode in der Kapillare als Anode diente und ein Strom von ungefähr 1 µAmpere eingestellt wurde.

2.5. Präparationsmethoden für die licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Das Blockschema gibt eine Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Präparationsmethoden für die licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen; weitere Einzelheiten werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.



••••••▶ Meerrettichperoxidase-Nachweis; ——▶ Morphologie (Auswertung von Schnitten); -----▶ Oberflächendarstellung.

Abkürzungen: DAB Diaminobenzidin, FA Formaldehyd, GA Glutaraldehyd, KPT "Kritischer-Punkt"-Trocknung, LM Lichtmikroskopie, PBS Phosphat-gepufferte Salzlösung, REM Rasterelektronenmikroskopie, TEM Transmissions-Elektronenmikroskopie, UA Uranylacetat.

2.5.1. Nachweisreaktion der Meerrettich-Peroxidase: Eine halbe bis drei Stunden nach der Meerrettich-Peroxidase-Injektion wurden die Präparate in 0,5 % Glutaraldehyd (vergleiche Kapitel II. 2.5.2.) zunächst eine Stunde bei Raumtemperatur, dann einige Stunden bei 4°C schonend fixiert. Nach dem Waschen in PBS wurden sie in 0,05 % Diaminobenzidin (DAB) in PBS 10 Minuten inkubiert, dann in 0,05 % DAB mit Zusatz von 0,02 % Wasserstoffperoxid 10 bis 15 Minuten stehen gelassen (modifiziert nach LaVail, 1974).

Statt mit DAB wurde die Nachweisreaktion auch mit Benzidindihydrochlorid (Mesulam 1976, Adams, 1977) und dem Hanker-Yates-Reagent (Gabe von Prof. G. Gerisch; Hanker, 1977) durchgeführt.

Alle Gefäße und Geräte, die mit diesen möglicherweise krebserregenden Reagentien für den Meerrettichperoxidase-Nachweis (vor allem DAB!) in Berührung gekommen waren, wurden anschliessend zur Dekontamination mit einer Natriumhypochlorit-Lösung (oder Natron-Bleichlauge) behandelt (Adams, 1977).

2.5.2. Fixierung. Zur chemischen Fixierung der Kulturen und Gewebe wurde 25 %iger Glutaraldehyd (MERCK, Darmstadt) verwendet, der mit Aktivkohle (Entfernung der polymeren Produkte) und dem Ionenaustauscher "Amberlite" (Entfernung der freien Glutarsäure) gereinigt und dessen Konzentration photometrisch nachbestimmt worden war (H. Schwarz, persönliche Mitteilung; Anderson, 1967; Gillett, 1972).

Zur schonenden Vorfixierung der Kulturen für die Meerrettichperoxidase-Nachweisreaktion wurde Glutaraldehyd in einer Konzentration von 0,5 % in phosphatgepufferter Salinelösung (PBS) benutzt.

Für die morphologischen Untersuchungen wurden die Kulturen in 2,5 % Glutaraldehyd in PBS eine Stunde bei Raumtemperatur fixiert, dann das Fixans erneuert und bei 4°C aufbewahrt, wobei das Fixans nochmals nach einigen Stunden und nach einem bis zwei Tagen erneuert wurde.

Gewebe (z.B. Retina) wurde wie die Kulturen fixiert, nur daß zur schnelleren Penetration des Fixans ins Gewebe die Primärfixierung in einer Mischung aus dem oben beschriebenen Glutaraldehyd und frisch gelöstem Paraformaldehyd (Karnovsky, 1965) erfolgte.

Für die Einbettung wurden die Proben nach der Aldehydfixierung in PBS gewaschen und mit 1 % OsO_4 in PBS (Kulturschalen 30 Minuten, Gewebe zwei Stunden) bei 0°C im Dunkeln nachfixiert. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser gewaschen.

Proben für die "Kritischer-Punkt"-Trocknung wurden nur nach kurzer Fixierungszeit (ca. 1 Stunde) im Glutaraldehyd mit OsO_4 nachfixiert; bessere Ergebnisse wurden nach längerer Glutaraldehydfixierung mit mehrfachem Wechsel des Fixans (s.o.) ohne OsO_4-Nachfixierung erzielt.

2.5.3. Einbettung. Die Präparate für die Einbettung wurden in einer aufsteigenden Äthanolreihe (15 - 100 %) entwässert und in Epon 812 (ROTH, Karlsruhe) eingebettet, das 48 Stunden bei 60°C polymerisierte.

2.5.4. Herstellung der Schnitte. Semidünnschnitte von 2 - 4 µm Schnittdicke wurden mit dem Pyramitom (LKB, Stockholm) und von 1 - 2 µm Schnittdicke mit dem Mikrotom Ultracut (REICHERT, Wien) mit Glasmessern hergestellt und auf Gelatine-beschichtete Objektträger gebracht. Ultradünnschnitte wurden mit dem Mikrotom Ultro-

tom IV (LKB, Stockholm) mit einem Diamantmesser gewonnen und auf mit Pioloform-befilmten Kupfernetzchen oder 2 x 1 mm Einlochblenden aufgenommen.

2.5.5. Kontrastierung. Für die morphologischen Untersuchungen wurden die Proben in der 70 %-Alkoholstufe zwei Stunden mit 2 % Uranylacetat blockkontrastiert. Die Ultradünnschnitte wurden in der Regel mit alkalischem Bleicitrat (Venable, 1965) nachkontrastiert; in manchen Fällen wurde davor eine weitere alkoholische Uranylacetatkontrastierung durchgeführt.

Die Semidünnschnitte der mit Meerrettich-Peroxidase gefärbten Präparate wurden direkt im Lichtmikroskop im Differential-Interferenz-Kontrast (II. 2.6.1.) und im Durchlicht ausgewertet, während die Schnitte für die morphologischen Untersuchungen von Retinagewebe und -explantaten mit Toluidinblau-O angefärbt wurden.

2.5.6. "Kritischer-Punkt"-Trocknung. Die "Kritischer-Punkt"-Trocknung wurde in einem Critical Point Drying Apparatus E3000 (POLARON EQUIPMENT Ltd., Watford, England; vertreten durch Dr. W. HERT KG, München) mit CO_2 durchgeführt, die in zwei Punkten von der Bedienungsanleitung abwich (Claviez, 1976; McKanna, 1979): (i) Äthanol als Entwässerungsmedium wurde ohne weiteres Intermedium gegen CO_2 ausgetauscht. (ii) Sowohl während des Austausches von Alkohol gegen CO_2 als auch während des Aufheizens des Apparates war die Kammer immer ganz mit Flüssigkeit angefüllt.

2.6. Mikroskopie

2.6.1. Lichtmikroskopische Beobachtung, Fotografie und Herstellung von Zeitrafferfilmen. Für die Lichtmikroskopie wurden folgende Mikroskope verwendet:

1. AXIOMAT (ZEISS), inverse Bauweise, Phasenkontrast und Differential-Interferenz-Kontrast. Für das Objektiv Plan 5x/O,12 wurde auf fotografischem Wege (Glasdiapositiv Perutz) eine Phasenplatte hergestellt, deren Position im Kondensor von Hand korrigiert werden konnte. Damit war es möglich, eine viermal so große Fläche wie mit dem Objektiv Plan 10x/O,22 im Phasenkontrast zu beobachten und zu fotografieren, was viel Zeit und Filmmaterial ersparte. Filmmaterial: Ilford Pan F(= 18 DIN).

2. DIAVERT (LEITZ). Dieses ebenfalls invers gebaute Mikroskop stand im Wärmeraum bei 37°C und war von einer Plexiglashaube umgeben, in der eine 4:96 CO_2:Luft-Atmosphäre aufrecht erhalten werden konnte. Die aufgesetzte Videokamera (NATIONAL Model WV - 261) war mit einem Videoaufzeichnungsgerät (NATIONAL Time Lapse V TR NV-8030) verbunden. Um Zeitrafferfilme geeigneter Geschwindigkeit herstellen zu können, baute die Elektronikwerkstatt des Max-Planck-Instituts für Virusforschung einen Zeitgeber, der Aufnahmen in Sekunden- bis Minutenabständen erlaubte und zusätzlich einen elektromagnetischen Verschluß steuerte, sodaß das Objekt nur für die Dauer der Aufnahme mit Licht bestrahlt wurde. Eine für die Verfolgung von auswachsenden Nervenfasern geeignete Geschwindigkeit ergibt sich durch Aufnahmen im Abstand von fünf Sekunden; die Wiedergabe erfolgt dann mit 50 Bildern pro Sekunde.

3. UNIVERSAL - Photomikroskop (ZEISS), bestückt mit einem Objektiv Planneofluar 25x/O,8 W-Oel. Mit diesem Mikroskop wurden die Aufnahmen der Semidünnschnitte für die Abbildung 24 hergestellt. Filmmaterial: Agfaortho professional (= 15 DIN).

2.6.2. Elektronenmikroskopie. Für die Untersuchungen der Ultradünnschnitte standen die Transmissions-Elektronenmikroskope Elmiskop IA und Elmiskop 102 (SIEMENS) zur Verfügung, die mit 60 oder 80 KV Strahlspannung betrieben wurden.

Die Raster-Elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem AUTOSCAN (ETEC, USA) bei 10 und 20 KV unter Verwendung einer 150 µm-Objektivaperturblende durchgeführt.

III. ERGEBNISSE

Für viele Probleme, die bei der Erforschung der Entwicklung des Nervensystems auftreten, erscheint es sinnvoll das Verhalten von Nervenzellen und -geweben "in vitro" zu studieren.

Unsere ersten Versuche zielten darauf ab, Bedingungen zu schaffen, unter denen Nervenzellen überhaupt wenigstens für einige Tage in einer Petrischale überleben und Nervenfortsätze ausbilden konnten. Dafür sind zwei Dinge wichtig: einmal muß das Medium alle Stoffe enthalten, die die Zellen unter "in vitro"-Bedingungen brauchen, zum anderen muß der Boden der Schalen so beschaffen sein, daß die Nervenfasern festhaften können.

Um geeignete Kulturbedingungen für eine lange Überlebenszeit der Nervenzellen und die Ausbildung von Nervenfortsätzen zu ermitteln, wurden sogenannte "Primärkulturen" (John Paul, 1959, 1980) untersucht: (i) Primärkulturen von Gehirnabschnitten 8 bis 10 Tage alter Hühnerembryonen (II. 2.1.2) nach Dissoziation mit Trypsin in Einzelzellen, und (ii) Primärexplantatkulturen von der Retina und vom optischen Tektum aus 5 bis 7 bzw. 8 bis 10 Tage alten Hühnerembryonen. (Zur Vereinfachung werden im Folgenden diese beiden Typen von Primärkulturen "Zellkulturen" und "Explantatkulturen" genannt).

1. Kulturbedingungen

1.1. Untersuchungen zur optimalen Zusammensetzung des Mediums

Zur Beurteilung der Qualität der Medien dienten folgende Kriterien: Morphologie der Zellen, Ausbildung von Fortsätzen,

Anzahl toter Zellen.

Zusammenfassung der Ergebnisse: Als Ausgangsmedium wurde das im Hause hergestellte, modifizierte Eagle's Medium genommen (Zusammensetzung siehe II. 1. unter Eagle's Medium (modifiziert)). Günstig für unsere Zwecke war eine Erniedrigung der Natriumbikarbonat-Konzentration von 0,37 % auf 0,24 % (II. 1.), was durch Zusatz von 10 mM HEPES-Puffersubstanz (II. 1.) ausgeglichen wurde.

Diesem Medium wurde 10 % Serum von foetalen Kälbern (Foetal Calf Serum, FCS) beigegeben. Mit Serum von neugeborenen Kälbern anstelle von FCS konnte man nur ein geringes Auswachsen von Fortsätzen beobachten. Menschliches Plazentaserum als Ersatz für FCS war ebenfalls ungeeignet, da dieses Serum bevorzugt das Wachstum der nichtneuronalen Zellen förderte.

Das Überleben von Nervenzellen wurde begünstigt durch 2 % Hühnerserum, zusätzlich zu FCS. Ebenfalls gute Ergebnisse wurden mit Rattenserum und Pferdeserum anstelle des Hühnerserums erzielt.

Der Zusatz von 1 % Embryoextrakt von Hühnchen oder von Rindern bewirkte, daß die Nervenfasern in Explantatkulturen früher und schneller auswuchsen als im Medium ohne Embryoextrakt. Schon 12 Stunden nach dem Auspflanzen konnte man um das Explantat einen dichten Strahlenkranz von Neuriten erkennen, die meist einzeln oder in dünnen Bündeln das Substrat besiedelten (siehe Kapitel III. 2.3.3.).

Konditioniertes Medium (Herstellung siehe II. 2.2.) von verschiedenen Gehirnabschnitten 8 bis 10 Tage alter Hühnerembryonen hatte den gleichen Effekt auf das Auswachsen der

retinalen Nervenfasern in Kultur wie Embryoextrakt-haltiges Medium.

Keinen Einfluß auf das Auswachsen und Überleben von Fortsätzen hatten der Nervenwachstums-Faktor (Nerve Growth Factor, NFG) und ein Glia-Faktor (beide isoliert und freundlicherweise uns überlassen von W. Seifert, Tübingen), die in Konzentrationen von 5 bis 50 Biologischen Einheiten pro Milliliter angewendet worden waren; ebenfalls wirkungslos war der Zusatz von 10^{-5}M Thioglycerol, das bei Zellinien von Hühnerfibroblasten die Differenzierung fördert. Die Erhöhung der Konzentration von Kaliumionen, die sich für das Überleben dissoziierter Nervenzellen von Rückenmark-Ganglien positiv auswirkte (Scott, 1977), hatte auf die Fortsätze der Retinaexplantaten eine schädigende Wirkung.

Nach diesen Untersuchungen wurde - soweit nicht anders angegeben - bei allen weiteren Versuchen zur Kultivierung von Nervenzellen das sogenannte "Standardmedium" benutzt, das neben 10 % FCS 2% Hühnerserum und 1 % Embryoextrakt enthielt (II. 2.2.).

1.2. Untersuchungen zur Optimierung des Untergrunds für das Auswachsen retinaler Nervenfasern: Nervenfortsätze können nur dann aus den Retinaexplantaten herauswachsen, wenn sie die Möglichkeit haben, sich auf den Untergrund festzuheften (Letourneau, 1975). Der Boden von unbehandelten Plastikschalen oder Glasschalen ist dafür nicht geeignet, er kann aber durch verschiedene Behandlungsmethoden für Zellen "klebrig" gemacht werden. Im Folgenden werden diese Behandlungsmethoden und ihre Wirkung auf das Anheften von Zellen und das Auswachsen

von Nervenfortsätzen beschrieben.

Nach Rappaport (1960) müssen die Oberflächen negative Ladungen tragen, die Natriumionen binden, damit sich Zellen anheften können. Die Hersteller von Plastik-Gewebekulturschalen behandeln die Oberflächen mit bestimmten Verfahren (z.B. ionisierende Strahlen), die Firmengeheimnis sind. Diese Schalen tragen dann die Bezeichnung "oberflächenbehandelt" oder "für Gewebekulturzwecke geeignet". Während sie für Zellkulturen bedingt geeignet sind, sind sie für Explantatkulturen unbrauchbar, da hier nie auswachsende Nervenfasern beobachtet werden konnten. Eine Behandlung der Schalen durch Glimmentladung scheint einen ähnlichen Effekt wie die obenerwähnte Oberflächenbehandlung zu haben: unbehandelte Plastikschalen hatten nach der Beglimmung ungefähr die gleichen Eigenschaften wie die oberflächenbehandelten. Sogar auf beglimmtes Glas (Objektträger) hefteten sich Zellkulturen an. Da der Effekt der Beglimmung nicht sehr lange (1/2 bis 1 h) anhielt, mußte eine solche Behandlung möglichst kurz vor Gebrauch durchgeführt werden.

Poly-Lysin- und poly-Ornithin-beschichtete Plastik- und Glasflächen (II. 2.3.3.) konnten als Wachstumsunterlagen sowohl für Zellkulturen als auch für Explantatkulturen benutzt werden. Aus den Explantaten wuchsen allerdings häufig weniger Fasern aus als auf Kollagen (s.u.)

Kollagenschichten, die man in Ammoniakatmosphäre oder an der Luft eintrocknen ließ (II. 2.3.2.a)), waren ebenfalls gute Wachstumsunterlagen. Zellen bleiben darauf zwar weniger gut haften als auf poly-Lysin und poly-Ornithin, aber es fand

ein ausgeprägteres Auswachsen von Fasern statt.

Die in Kapitel II. 2.3.4.b) und c) beschriebenen Kollagengeflechte erwiesen sich als die geeignetsten Wachstumsunterlagen, um das Auswachsen von Retinaneuriten zu studieren. Nur auf diesen (abgesehen von Zellschichten als Substrat, s.u.) wuchsen so viele Neuriten so schnell und weit und frei von mitauswachsenden, nicht-neuronalen Zellen, wie es z.B. in den Abbildungen 16, 21 und 28 zu sehen ist.

Auf konfluenten Zellrasen von Gliazellen des optischen Nerven von Rattenembryonen (s. II. 2.1.2.) wuchsen Retinaexplantate besonders gut aus, doch war die mikroskopische Untersuchung der Fasern durch die Zellen der Unterlage beeinträchtigt (vergl. Abb. 12 und 22). Der Zellrasen übt wahrscheinlich in zweifacher Hinsicht einen positiven Einfluß auf die Nervenzellen aus: zum einen sind die Zelloberflächen in mechanischer Hinsicht ein guter Untergrund, zum anderen haben die Zellen möglicherweise noch eine ernährende Funktion, entweder direkt oder durch Faktoren, die sie ins Medium abgeben (Konditionierung).

2. Wachstum der Fasern

Bei der Untersuchung von Kulturen des Nervensystems ist vor allem die Frage interessant, inwieweit die neuronalen Zellen unter den künstlichen Bedingungen eines "in vitro"-Systems überleben und sich differenzieren können. Zum Zeitpunkt der Entnahme der Retinaexplantate von 5 bis 7 Tage alten Hühnerembryonen sind die neuronalen Zellen fast alle postmitotisch; es teilen sich nur noch die nicht neuronalen Zellen. Das bedeutet, daß man keine Vermehrung der neuronalen Zellen

erwarten darf. Die Zelldifferenzierung jedoch ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen und sollte auch in vitro noch stattfinden. Ein Differenzierungsmerkmal von Nervenzellen ist das Aussenden von Fortsätzen, den Axonen und Dendriten, die mit dem neutralen Sammelbegriff "Neuriten" bezeichnet werden.

Massives Auswachsen von Neuriten nun fand in unseren Explantatkulturen statt: pflanzte man Retinastückchen von 5 bis 7 Tage alten Hühnerembryonen unter geeigneten Bedingungen aus, wie sie in Kapitel III.1. herausgestellt worden sind, so konnte man nach ungefähr einem Tag ein extensives Auswachsen von Retinafasern beobachten. Bevor nun auf das Verhalten dieser Neuriten näher eingegangen wird, soll zunächst die Entwicklung der Retina vom 5. bis 11. embryonalen Tag "in vivo" mit der "in vitro" verglichen werden und die zelluläre Abstammung der Neuriten diskutiert werden.

2.1. Vergleich der Retina-Entwicklung "in vivo" und "in vitro"

Charakteristisch für die Entwicklung der embryonalen Hühnchen-Retina vom Tag 6 bis 9 ist die Ausbildung von Zell- und Faserschichten parallel zu ihren begrenzenden Membranen (siehe Abb. 2 a-e). Zunächst sieht man zwischen den Zellen der Retina und der inneren begrenzenden Membran (diese grenzt an den Glaskörper des Auges) eine Schicht der ersten Ganglionaxone vermischt mit den Fortsätzen der Müller-Glia-Zellen. Am 8. Tag erkennt man die Ganglion-Zell-Schicht, die in der frühen Entwicklung aus mehrern Lagen besteht und erst später durch die Flächenzunahme der Retina einschichtig wird. Sie hebt sich durch die innere plexiforme Schicht von der inneren Körnerschicht mit Kernen der Amakrin- und Müller-Glia-

Zellen ab. Etwas später entsteht die äußere Körnerschicht mit den Kernen der Photorezeptor-Zellen, die von der inneren Körnerschicht mit den Kernen der Horizontal- und Bipolar-Zellen durch die äußere plexiforme Schicht abgetrennt ist.

Die Entwicklung in Kultur verläuft etwas langsamer als im Tier und ist geprägt von einer starken Tendenz des Gewebes, sich umzuorientieren. Abb. 2 f-n zeigt Schnitte von Retina-Explantaten, die am 6. embryonalen Tag (E6) ausgepflanzt und 1- 5 Tage in Kultur gehalten worden waren. Für die Explantate in f - i war die Retina in 400µm große Quadrate geschnitten worden, für die in k-n in 300µm breite Streifen auf Membran-Filter, die oben am Bildrand jeweils als helle Streifen zu erkennen sind. In beiden Fällen wurde schon nach einem Tag eine starke Veränderung der ursprünglichen Schichtung beobachtet. Diese ist die Folge einer Invagination der äußeren begrenzenden Membran, die aus einer Zone von starken, elektronendichten Kontaktstellen (tight junctions, siehe Pfeile in Abb. 3) zwischen den Fortsätzen der Müller-Glia-Zellen und den Photorezeptor-Zellen besteht. Nach drei Tagen in Kultur bildeten sich in den Lumina dieser Invaginationen Ansätze der

Legende zu Abb. 2

Entwicklung der embryonalen Hühnchenretina in vivo (a-e) von Tag 6 bis 11 (E6 - E11) und in vitro (f-i bzw. k-n) ab Tag 6 (1-5 Tage in Kultur). Mit Toluidinblau angefärbte Semidünnschnitte. Einzelheiten siehe Text.

ä b M äußere begrenzende Membran, ä K S äußere Körnerschicht (Photorezeptorzellen), ä pl S äußere plexiforme Schicht, i K S innere Körnerschicht (Horizontal-, Bipolar-, Müller-Glia- und Amakrinzellen), i pl S innere plexiforme Schicht, GS Ganglionzellschicht, FS Faserschicht, i b M innere begrenzende Membran (fehlt in d und e präparationsbedingt).

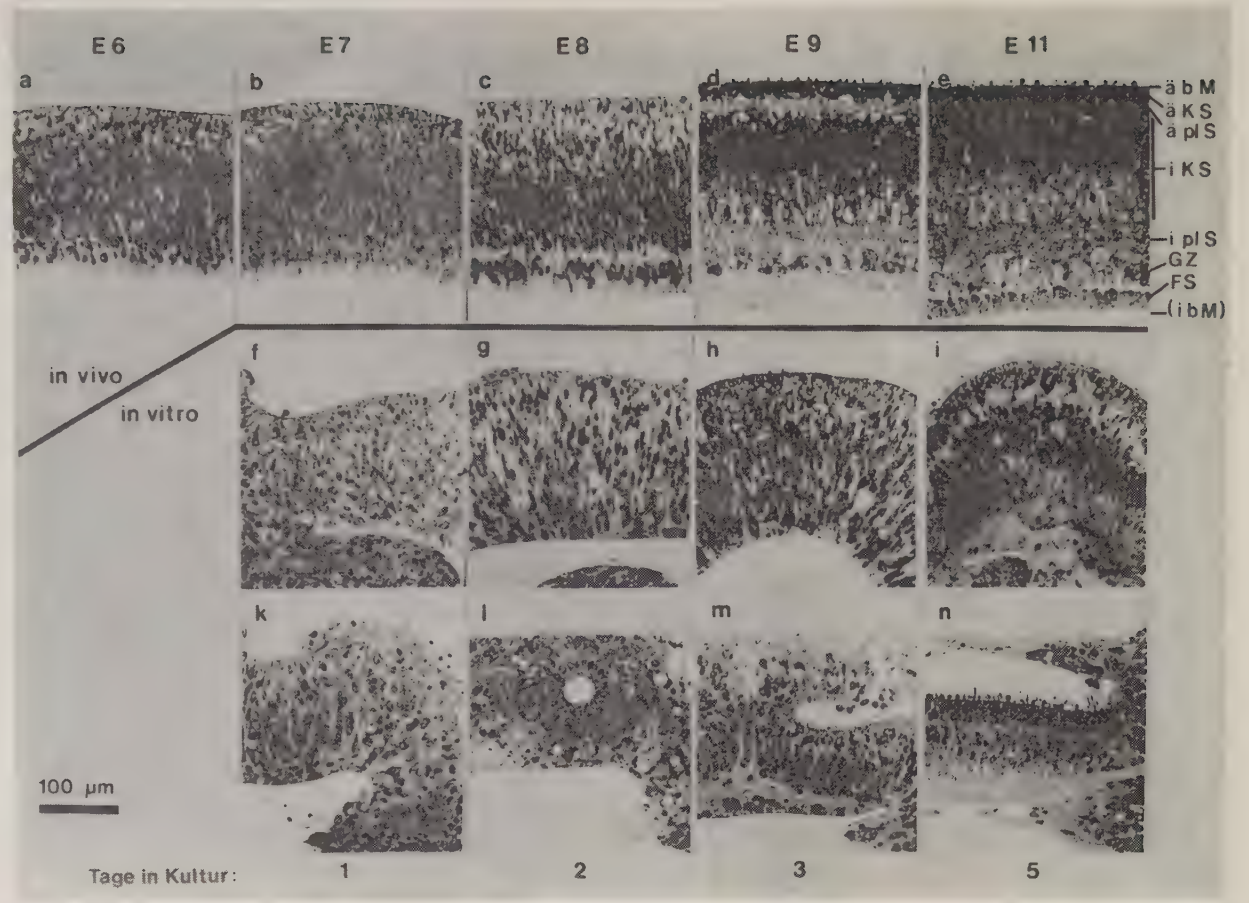

E6
E7
E8
E9
E11
a
b
c
d
e
äbM
äKS
äplS
iKS
iplS
GZ
FS
(ibM)
in vivo
in vitro
f
g
h
i
k
l
m
n
100 µm
Tage in Kultur:
1
2
3
5

Abb. 2

Abb. 1

äußeren Segmente der Photorezeptor-Zellen aus (Abb.2h,i,m,n), die sich nicht von denen in vivo unterschieden (d,e). Auch im Elektronenmikroskop konnte kein Unterschied festgestellt werden (Abb. 4). Sowohl in vitro als auch in vivo waren sie mit vielen großvolumigen Mitochondrien angefüllt. Die äußere plexiforme Schicht war in vitro ungefähr einen Tag später als in vivo zu finden und war nicht so stark ausgeprägt (in h ist sie nicht zu erkennen, in m nur undeutlich; in i sind die Schichten überhöht, da die Schnittebene nicht senkrecht zur Schichtung verläuft; in n ist sie deutlich). Außerdem ist in Abb.2i und n die Unterteilung der inneren Körnerschicht in die Kerne der Horitonal- und Bipolar-Zellen außen und Amakrin- und Müller-Glia-Zellen innen zu erkennen (Kahn, 1974). Das bedeutet, daß sich auch in vitro die Schichtenabfolge von außen (photorezeptorzellschicht mit äußerer begrenzender Membran) nach innen (jedoch nur bis zur inneren plexiformen Schicht) ausbildet, obwohl sich die äußere Schicht nicht mehr an der Peripherie des Gewebes befindet. Dagegen bildeten die Ganglionzellen "in vitro" an der inneren begrenzenden Membran (in den Schnitten jeweils unten), wo sie aufgrund der Entwicklung "in vivo" zu erwarten wären, keine diskrete Zellschicht aus.

Legende zu Abb. 3

Embryonale Hühnchenretina. Äußere begrenzende Membran: "tight junctions" (Pfeile zwischen Photorezeptorzellen und Müller-Glia-Zellen. Die Ultradünnschnitte stammen von denselben Präparaten wie die Semidünnschnitte in Abb.2: a) entspricht Abb.2b (= E 7), b) entspricht Abb.2e (= E 11), c) entspricht Abb.2k (1 Tag in Kultur), d) entspricht Abb.2n (5 Tage in Kultur).

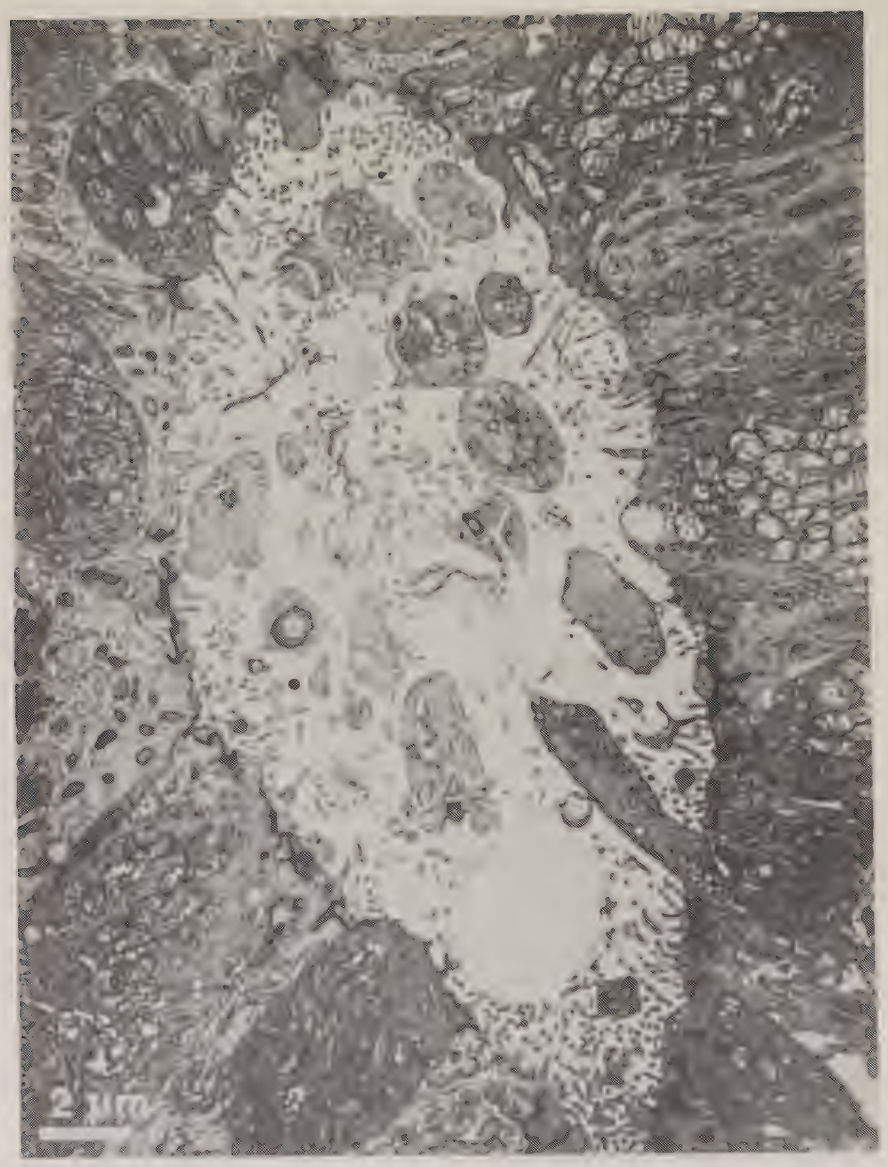


Abb.4 Embryonale Hühnchenretina, 5 Tage in Kultur. Zone der äußeren begrenzenden Membran, durch Invagination ins Explantatinnere gelangt. Ultradünnschnitt, gleiches Präparat wie in Abb.2n und 3d (andere Ebene). Im Lumen dieser Invagination sind die quergeschnittenen äußeren Segmente der Photorezeptorzellen umgeben von zahlreichen, dünnen Fortsätzen (Microvilli, meist quergeschnitten) der Müller-Glia-Zellen.

2.2. Herkunft der Fasern

Wir sind der Ansicht, daß die aus Retinaexplantaten auswachsenden Fasern Axone der Ganglionzellen sind. Sie sind nämlich die einzigen Nervenfasern, die in vivo aus dem Retinagewebe herauswachsen und mehrere (4-5) Millimeter lang werden. Die einfachste Methode, diese Annahme zu bestätigen, wäre, sie bis zu ihren Zellkörpern zurück zu verfolgen und diese nach morphologischen oder histologischen Kriterien zu identifizieren. Das ist aber nicht möglich, da Ganglionzellen weder aufgrund ihres Aussehens noch durch spezifische Anfärbungen eindeutig klassifiziert werden können. Die Zellen aufgrund ihrer Lage im Retinagewebe zu identifizieren ist gerade bei Ganglionzellen schwierig, da diese in vitro keine diskrete Zellschicht ausbilden (siehe voriges Kapitel). Folgende Überlegungen und Beobachtungen sprechen aber stark dafür, daß es sich bei den in vitro aus Retinaexplantaten auswachsenden Fasern tatsächlich um Fasern von Ganglionzellen handelt:
(i) Zählt man die aus Retina-Explantatstreifen definierter Größe auswachsenden Fasern und berechnet hieraus die Gesamtzahl für die ganze Retina, so erhält man eine erstaunlich gute Übereinstimmung mit der Anzahl von Nervenfasern im optischen Nerven in vivo. Dem liegen folgende Zahlen zugrunde: Rager (1976) ermittelte die Anzahl von Nervenfasern in optischen Nerven von Hühnerembryonen durch Auswertung von Schnitten 0,5 mm rostral vom optischen Chiasma. Beim 7,5 Tage alten Hühnerembryo fand er 1×10^6 Fasern. Berücksichtigt man die Wachstumsgeschwindigkeit der Fasern, so entstammten sie den Ganglionzellen einer etwa einen Tag jüngeren Retina mit einer Fläche von 60 - 65 mm^2 (Coulombre, 1955). Hieraus ergeben sich Zahlen von ca. 15 400 bis 16 600 Fasern pro mm^2 Retina.

Um die Anzahl der aus 300 µm breiten Retinaexplantat-Streifen auswachsenden Fasern (ähnlich wie in Abb.27 und 29; Herstellung siehe II. 2.1.1.) zu ermitteln, wurden Ultradünnschnitte im Elektronenmikroskop ausgewertet. Dazu wurden die Kulturen in Epon eingebettet (II. 2.5.3.) und Schnitte im Abstand von ca. 0.5 mm von den Streifen senkrecht zur Wachstumsebene hergestellt. Auf einer Länge von 0.735 mm wurden in der ursprünglich ventralen Richtung (die Orientierung entspricht der in Abb.27 b) 2611 und auf der gegenüberliegenden Seite 1247 Fasern gezählt. Auf einem Quadratmillimeter hochgerechnet ergibt dies 15 900 Fasern was im Bereich der oben angeführten Schätzung der Faseranzahl im Tier liegt.

(ii) Weiterhin wurde der Versuch unternommen, die Zellkörper der Fasern direkt sichtbar zu machen. Dabei wurde die Tatsache ausgenutzt, daß durch retrograden Transport an den Enden der Neurite angebotene Meerrettich-Peroxidase (Horse Raddish Peroxidase, HRP) in das Perikaryon transportiert und dort nachgewiesen werden kann (LaVail, 1974). Dazu wurden mit einer HRP gefüllten Glaskapillare Fasern verletzt, während man die HRP-Lösung langsam austreten ließ (II. 2.4.2.). Nach zweistündiger Inkubationszeit wurden die Kulturen fixiert (II. 2.5.2.) und später die HRP (II. 2.5.1.) angefärbt.

Eine Schwierigkeit bei der Auswertung dieser Experimente lag darin, daß viele Explantate überfärbt waren. Das HRP verteilte sich nämlich auch durch Diffusion und färbte somit auch Zellen unspezifisch an. In manchen Fällen jedoch konnten Fasern klar bis zu ihren Zellkörpern verfolgt werden: es waren immer große Zellen (ø ca. 15 µm), die angefärbt waren und sie befanden sich auf der den Fotorezeptorzellen gegenüberliegenden

Seite des Gewebes. Damit kann es sich bei den gefärbten Zellen nur entweder um Ganglionzellen oder um Amakrinzellen handeln. (iii) Die Neuriten wachsen so orientiert aus den Explantaten aus, wie dies bei den Axonen der Ganglionzellen in vivo der Fall ist. Stellt man, wie in Kapitel II. 2.1.1. beschrieben, Retinastreifen auf Membran-Filtern her und pflanzt sie auf ungerichtetes, fibrilläres Kollagen aus, so läßt sich immer eine Vorzugsrichtung des Auswachsens hin zur ursprünglichen Lage der optischen Fissur erkennen. Dieses Phänomen ist in Kapitel III.4.1. beschrieben und deutlich in den Abbildungen 27 und 29 zu erkennen. Auf den möglichen Mechanismus, der zu diesem Auswachsmuster führt, wird in der Diskussion eingegangen. Im Zusammenhang mit der Frage nach der Herkunft der Fasern ist festzustellen, daß diese Richtung der Orientierung der Ganglionzellaxone im Explantat entspricht. Damit ist es sehr wahrscheinlich, daß es sich bei den in vitro auswachsenden Retinafasern um Ganglionzellaxone handelt.

2.3. Morphologie der Faserbündel von Explantatkulturen der embryonalen Hühnchenretina

In diesem Kapitel wird das Auswachsen von Fasern auf verschiedenen Unterlagen und in verschiedenen Medien beschrieben.

2.3.1. Das Auswachsen von Fasern auf zweidimensionalem Substrat:

Im Organismus sind auswachsende Axone von einer dreidimensionalen, extrazellulären Matrix und den Fortsätzen neuroepithelialer Zellen umgeben (Silver und Wakely, 1974). Diese Be-

dingung ist nicht erfüllt, wenn die Fasern auf einer zweidimensionalen Unterlage auswachsen. Daher sollen die Beobachtungen in den folgenden Kapiteln nicht als Versuch verstanden werden, in vivo-ähnliche Vorgänge zu beschreiben, sondern als Versuch, grundlegende Verhaltensweisen der Fasern zu erkennen.

Um das Auswachsen von Neuriten aus Retinaexplantaten zu beobachten, wurden Zeitrafferfilme hergestellt (II. 2.6.1.). Eine hohe lichtmikroskopische Auflösung wurde dadurch erreicht, daß Deckgläschen anstelle der Plastikböden in die Kulturschalen eingeklebt worden waren (II. 2.3.2.), die mit Kollagen beschichtet wurden (II. 2.3.4.a). In den ersten drei Stunden nach der Explantation waren nur Bewegungen im Zellverband des Explantats sichtbar, das sich oft etwas abrundete. Dabei schrumpfte es in seinem Außendurchmesser, einige Zellen blieben über dünne Fortsätze in Kontakt mit der Unterlage. Dann flachte sich das Explantat in der Regel etwas ab und Zellen am Rand des Explantats nahmen zusätzlich Kontakt mit dem Untergrund auf. Die oben erwähnten dünnen Fortsätze waren dann nicht mehr zu erkennen, dafür erschienen die ersten Wachstumskegel von Neuriten, erkennbar an den Bewegungen ihrer Fortsätze, den Filopodien (microspikes) und Lamellipodien (ruffling membranes).

In Abb. 5, 6 und 7 sind Wachstumskegel mit verschiedenen mikroskopischen Techniken dargestellt (siehe Legenden). Filopodien sind deutlich in der Raster-elektronenmikroskopischen Aufnahme von Abb.5 zu erkennen. Sie haben manchmal Kontakt mit den dünneren Kollagenfibrillen. Bei den Wachstumskegeln in Abb.6 sind Lamellipodien ausgebildet, die sich an anderen Fasern entlangtasten.

Im Zeitrafferfilm waren die Wachstumskegel schon ab drei Stunden nach dem Auspflanzen zu beobachten, doch zogen sie sich zunächst immer wieder zurück. Erst nach einem halben Tag blieben sie auf dem Kollagen-Untergrund haften und wuchsen aus. Die Fortsätze der Wachstumskegel wurden in alle Richtungen ausgebildet und wieder eingezogen. Fortwährend bildeten sich neue Fortsätze, die teilweise miteinander verschmolzen und wieder eingezogen wurden. Auf diese Weise wurde ein Bereich von 10 bis 50µm um den Wachstumskegel abgetastet. Manchmal blieb ein Kontakt eines Fortsatzes mit dem Untergrund

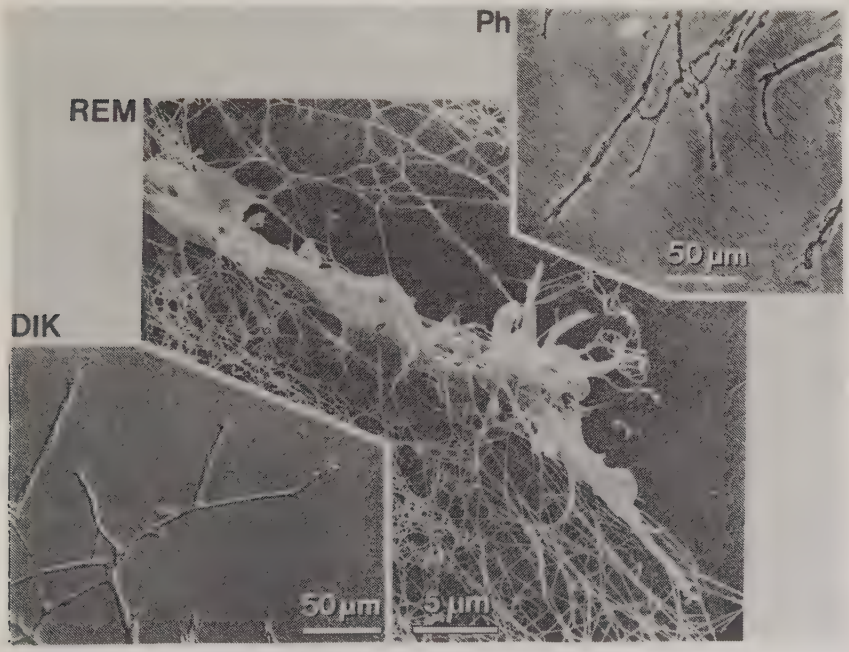


Abb.5 Wachstumskegel von Retinaneuriten, dargestellt mit verschiedenen mikroskopischen Methoden:
Ph Phasenkontrast;
REM im Raster-Elektronenmikroskop nach Gefriertrocknung (Claviez, 1976);
DIK Differential-Interferenz-Kontrast

bestehen, und sein Ende wurde zum neuen Vorderende des Neuriten, von dem nun die Fortsätze ausgebildet wurden. Der anfangs oft kurvige Verlauf des Neuriten unmittelbar hinter dem Wachstumskegel begradigte sich während des Weiterwachsens, so daß die resultierende Wachstumsrichtung der Richtung des proximalen Teils der Faser entsprach. Dabei konnte sich die gesamte Lage der Faser relativ zum Untergrund verändern - die Fasern kleben also nicht irreversibel am Untergrund fest (siehe Abbildung 7). Die Begradigung des Faserverlaufs kann am besten durch Zugkräfte erklärt werden, unter denen die Fasern stehen. Solche Zugkräfte hat Nakai (1960) an Filopodien und Bray (1979) an den Fortsätzen einzelner Nervenzellen von Rückenmarkganglien analysiert.

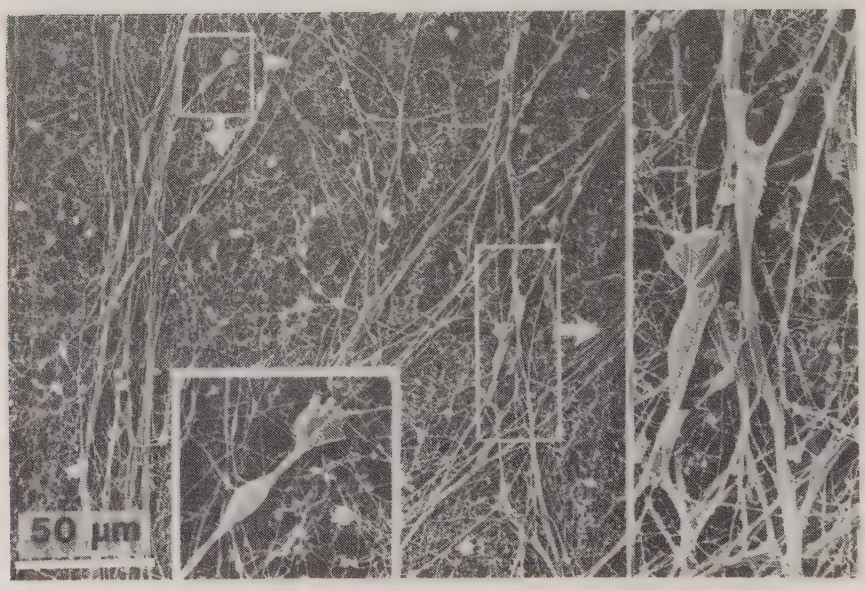


Abb.6 Retinafasern mit Wachstumskegeln (siehe Ausschnitte) auf fibrillärem Kollagen. Raster-elektronenmikroskopische Aufnahme nach "Kritischer-Punkt"-Trocknung

Meistens folgten einer Faser weitere Wachstumskegel, die an der Aktivität ihrer Filopodien und Lamellipodien im Zeitrafferfilm gut zu erkennen waren (Pfeile in Abb.7b und c) und entlang dem Bündel vor- und auch zurückwanderten. Ab und zu kommt es zu Verzweigungen, bei denen einzelne Fasern oder Bündel einen neuen Weg, weg vom alten Bündel, einschlagen. Viele dieser Verzweigungen werden wieder aufgehoben, wenn Wachstumskegel auf ihrem Weg wieder auf das Bündel stoßen, dem sie ursprünglich angehörten.

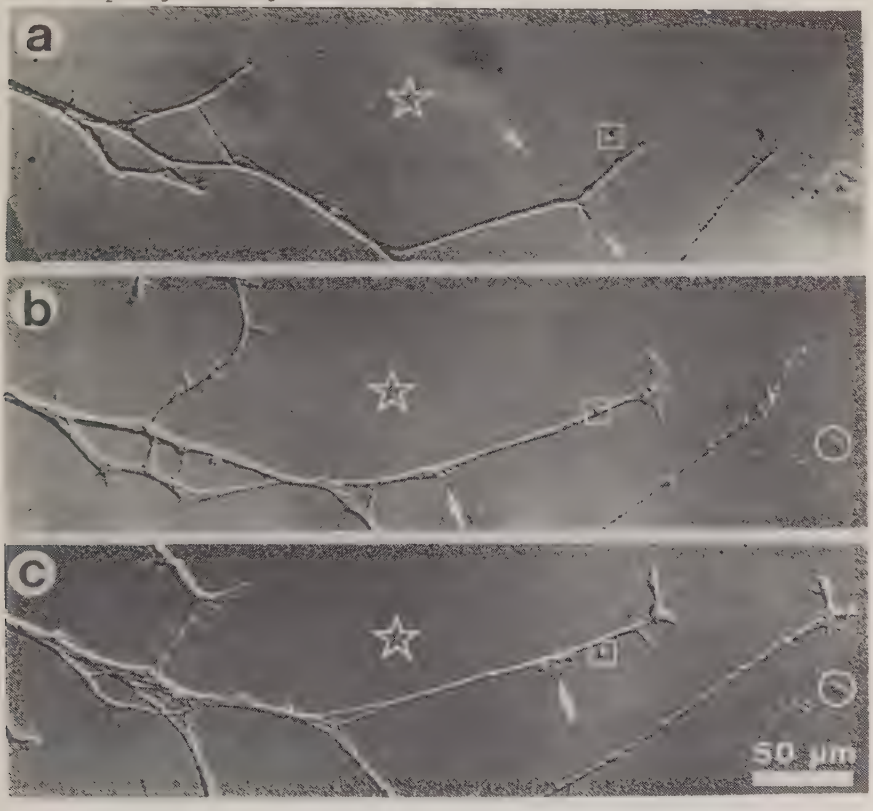


Abb.7 Retinaneuriten, auf einem mit denaturiertem Kollagen beschichteten Deckglas auswachsend (Differential-Interferenz-Kontrast). Die Aufnahmen a, b und c wurden jeweils im Abstand von einer Stunde gemacht. Die offenen Symbole kennzeichnen Unebenheiten im Untergrund. Die Pfeile markieren Fortsätze von nachfolgenden Wachstumskegeln.

Abb. 8 Faserbündel aus Retinaexplantaten auf denaturiertem Kollagen. a) Phasenkontrast b) Differential-Interferenz-Kontrast

Die Häufigkeit des Auftretens von Verzweigungen und ihre Richtung scheint unter Kulturbedingungen, bei denen die Fasern weder einzeln noch in sehr dicken Bündeln auswachsen (vgl. Kapitel III. 2.3.2.), nicht ganz zufällig zu sein. In Abb. 8a und b fällt auf, daß dort, wo die Faserbündel nicht mit anderen Bündeln zusammentreffen, die Verzweigungsgabeln einen gewissen Mindestabstand voneinander (ungefähr 100 µm) nicht unterschreiten und daß die Winkel zwischen den Ästen einer Verzweigung oft ähnlich sind. Abb.9 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Winkel (ausgemessene Winkel in Abb.8a und b durch Punkte markiert), die einen Gipfel bei etwa 30° mit einer steilen Flanke in Richtung kleinerer Winkel und einer weiten Streuung zu größeren Winkeln aufweist.

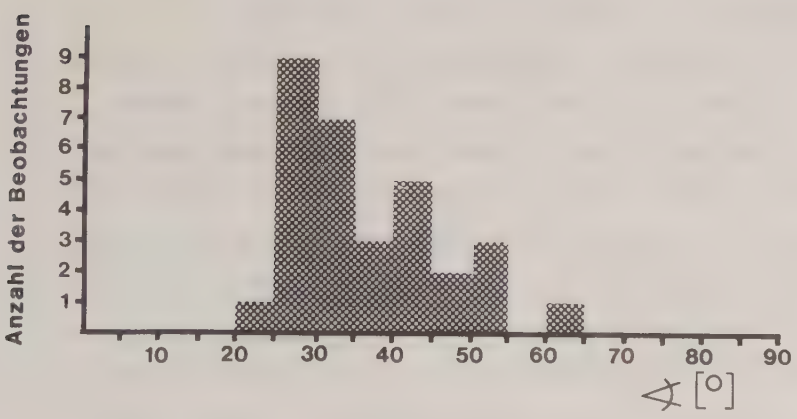


Abb.9 Häufigkeitsverteilung der in Abb.8 gemessenen und mit einem Punkt markierten Winkel zwischen den Verzweigungen von Faserbündeln

2.3.2. Das Auswachsen von Fasern aus Explantaten der embryonalen Hühnchenretina in Abhängigkeit vom Substrat: Das Auswachsen von Fasern aus Retinaexplantaten auf zweidimensionalem Untergrund hängt stark von dessen Beschaffenheit ab. Die Unterschiede liegen vor allem in der Wachstumsgeschwindigkeit, dem Grad der Bündelung der Fasern und der Linearität der Bündel.

Auf Unterlagen beschichtet mit denaturiertem Kollagen, poly-Lysin oder poly-Ornithin wuchsen die Retinafasern weniger schnell aus als auf Zelloberflächen oder auf fibrillärem Kollagen (siehe Kapitel III. 1.2.). Dies bezieht sich sowohl auf die Zeit von der Explantation bis zum Erscheinen von Fasern auf dem freien Substrat als auch auf die Geschwindigkeit des Auswachsens.

Wie bereits im Kapitel III. 2.3.1. beschrieben, wuchsen auf denaturiertem Kollagen die ersten Fasern einen halben Tag, meist sogar erst einen Tag nach Explantation aus. Auf fibrillären Kollagenschichten erschienen Fasern manchmal schon nach drei Stunden, meist jedoch zwischen sechs und zwölf Stunden. Bei Explantaten auf Oberflächen von Gliazellen des optischen Nervs, die einen mehr oder weniger konfluenten Monolayer bildeten (siehe Kapitel II. 2.1.2. und III. 1.2.), waren in der Regel bereits zwei bis sechs Stunden nach der Explantation auswachsende Fasern sichtbar.

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Fasern wurde errechnet, indem Aufnahmen zu verschiedenen Zeiten zwischen dem ersten und dritten Tag nach dem Auspflanzen hergestellt und die Längenzunahme der Fasern gemessen wurde. Dabei erhielt man Durchschnittswerte, da - wie Zeitrafferfilme zeigen - das

Auswachsen nicht immer gleichmäßig schnell erfolgte. Für Fasern auf denaturiertem Kollagen wurden Geschwindigkeiten um 15 µm, selten bis 30 µm pro Stunde gemessen; ähnliche Werte gelten auch für poly-Lysin. Auf fibrillärem Kollagen ergaben sich Geschwindigkeiten von 20 bis 40 µm. Auf Zellrasen wuchsen Fasern in einer Stunde 40 bis 60 µm weit aus.

Der Faserverlauf und die Bündelung der Fasern hängen stark von der Beschaffenheit der Unterlage ab. Abb.10 zeigt Explantate embryonaler Hühnchenretina auf denaturiertem Kollagen (a), fibrillärem Kollagen (b) und auf einem Zellrasen (c), jeweils zwei Tage nach dem Auspflanzen.

Auf denaturiertem Kollagen sind die Fasern zu unterschiedlich dicken Bündeln zusammengefaßt, zwischen denen oft größere Flächen freibleiben. Offensichtlich ist die Affinität der Fasern zum Substrat gering, und die einzelnen Fasern wachsen bevorzugt an Nachbarfasern entlang; deshalb findet man relativ wenige, dafür dicke Faserbündel und somit auch wenige Kontaktstellen mit anderen Bündeln. Dabei kreuzen sie meist den Kurs anderer Bündel und schwenken nur selten in eine gemeinsame Richtung ein (Abb.10a).

Auf fibrillärem Kollagen dagegen (Abb.10b) ist die Umgebung der Explantate gleichmäßiger bewachsen. Die Faserbündel sind weniger dick als auf denaturiertem Kollagen, und häufig sind Einzelfasern zu erkennen. Die Fasern sind in einem höheren Maß parallel zur radialen Auswachsrichtung orientiert, verlaufen aber nicht so geradlinig wie auf denaturiertem Kollagen. Daher gibt es sehr viele Berührungs-

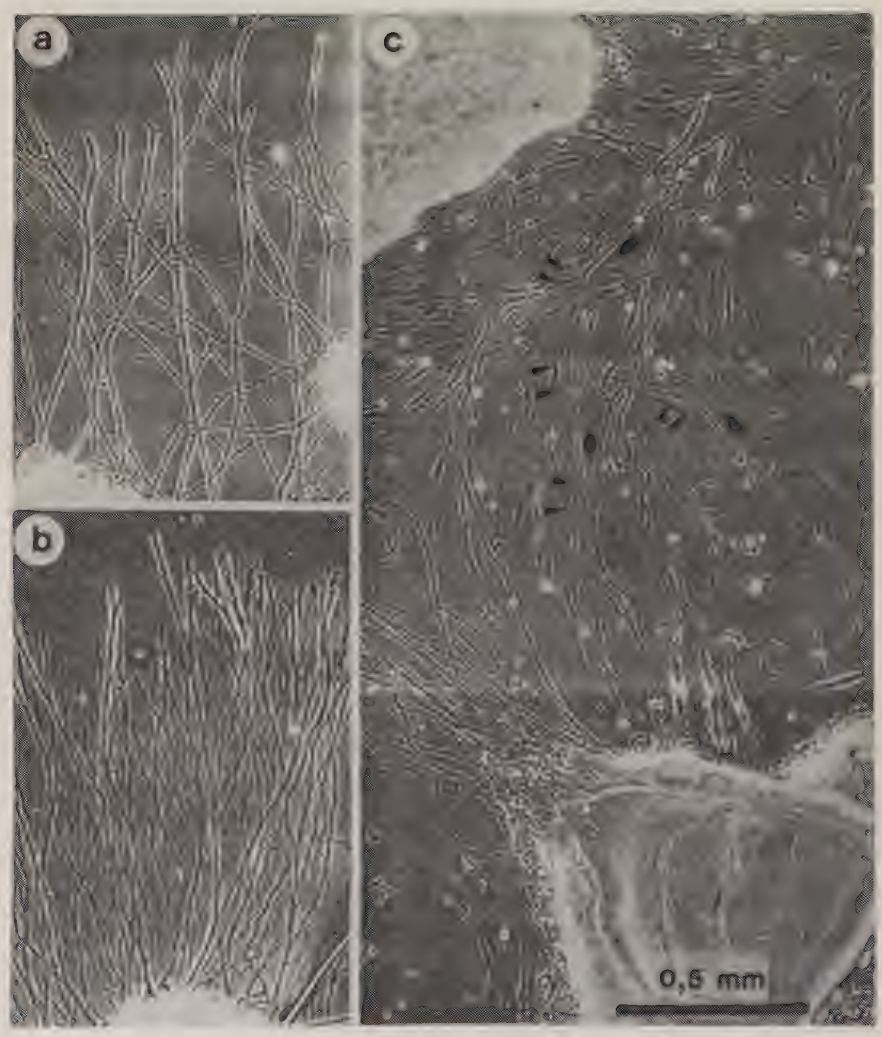


Abb.10 Retinaneuriten von Explantaten sechs Tage alter Hühnchenembryonen zwei Tage in Kultur auf verschiedenen Wachstumsunterlagen: a) auf denaturiertem Kollagen b) auf fibrillärem, ausgerichtetem Kollagen c) auf einem Zellrasen von Gliazellen des optischen Nerven der Ratte

und Überkreuzungspunkte, und Teilbündel gehen häufig auseinander, um sich kurz später wieder zu vereinigen. Da der Verlauf einzelner Fasern an solchen Überkreuzungsstellen im Lichtmikroskop nicht erkennbar ist, wurden Präparate für die Raster-Elektronenmikroskopie hergestellt. Die Untersuchung vieler Überkreuzungsstellen ergab, daß die meisten Fasern ihren ursprünglichen Kurs beibehielten, wenige sich dem überkreuzten Bündel anschlossen. Abbildung 11 zeigt eine

Abb.11 Überkreuzung von Retinafasern auf fibrillärem Kollagen. Raster-elektronenmikroskopische Aufnahme nach "Kritischer-Punkt"-Trocknung.

Stelle, wo sich zwei Faserbündel vereinen und ein anderes Bündel diese kreuzt (das Explantat befand sich rechts). Die Fasern sind in mehreren Ebenen miteinander verwoben, sie kreuzen ihre Bahn nicht als geschlossenes Bündel. An manchen Stellen, besonders am oberen Rand des Bildes ist zu erkennen, daß weitere Faserbündel noch unter dem Kollagengeflecht verlaufen. Ganz links tritt eine Faser aus dem Bündel hervor, die sich verzweigt. Solche Kollaterale waren selten zu beobachten.

Auf Zellen als Untergrund sind keine dicken Bündel zu finden, wie etwa auf denaturiertem Kollagen. Es überwiegen Einzelfasern, die sich immer wieder zu dünnen Bündeln zusammenfügen und wieder auffächern (siehe Pfeilköpfe in Abb.10c).(Auf die Wachstumsrichtung wird in Kapitel III.4.1. eingegangen.) Der Verlauf dieser Fasern ist auf den Zellen weniger gut zu erkennen als auf den kaum strukturierten Kollagensubstraten; in Zeitrafferfilmen jedoch erkennt man sie deutlich an ihren Bewegungen. So wurden die teilweise schon erwähnten Vorgänge beim Auswachsen, daß Fasern an anderen Fasern entlangwachsen, sich Faserbündel verzweigen und überkreuzen, in ihrer Dynamik in einem Film festgehalten. Einige wichtige Ausschnitte hieraus sind in Form von Einzelbildern in Abb. 12 zusammengestellt. Dabei wurde über einen Zeitraum von ca. 20 Stunden die Wechselwirkung von Neuriten untereinander und mit dem Substrat beobachtet: (i) Die Fasern richteten ihr Wachstum nach der Längsachse der Untergrundzellen aus (vgl. Kapitel III. 4.1.). Zwei Fasern wuchsen

Abb.12 Faserbündel von Retinaneuriten, auf einem Zellrasen von Gliazellen auswachsend. Die Bilder stammen aus einem Zeitrafferfilm, von dem einige vom Bildschirm abfotografiert wurden. Die relativen Zeitangaben sind oben links eingeblendet. Zwischen c) und d) wurde der Bildausschnitt um eine halbe Bildbreite versetzt (siehe Position des Sterns). Einzelheiten siehe Text

voraus (Pfeilspitzen in a-d), denen ein Faserbündel folgte (Pfeile in a-c). (ii) Ein Teil des Faserbündels blieb an einer Zelle vorübergehend hängen (Stern in Abb.12d) (Kontakthemmung), während der andere Teil des Bündels unter der Zelle hindurchwuchs (e). (iii) Das zurückgebliebene Teilbündel wuchs erst weiter, nachdem die Zelle sich vom Untergrund abgelöst hatte (sie ist in f als heller Fleck an der Position der linken Kontaktstelle der Zelle mit dem Untergrund zu erkennen), aber nicht mehr zusammen mit dem Bündel, dem es ursprünglich angehörte. (iv) Die Bündelung der Fasern wird durch nachfolgende Wachstumskegel verändert (offene Pfeile in k und l). Dies bedeutet, daß die Fasern nicht auf dem Untergrund festkleben und zeigt auch, daß die Fortsätze der Wachstumskegel, die mit mehreren Fasern gleichzeitig Kontakt haben, unter Spannung stehen (Nakai, 1960). (v) Ein weiteres Bündel kreuzte den Weg des ersten Bündels und behielt schließlich seine ursprüngliche Wachstumsrichtung bei, obwohl Fasern vorübergehend dem ersten Bündel in beide Richtungen folgten.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß für auswachsende Retinaneuriten sowohl fibrilläres Kollagen als auch Zellrasen optimale Wachstumsunterlagen sind. Es kommt auf das Ziel der Versuche an, welcher man den Vorzug gibt.

2.3.3. Das Auswachsen von Fasern aus Explantaten der embryonalen Hühnchenretina in Abhängigkeit vom Medium: Der wichtigste Bestandteil eines "in vitro"-Systems, der für das Weiterleben und Weiterentwicklung von Zellen bzw. Geweben in Kultur entscheidend ist, ist das Medium. In Kapitel II. 2.2. wurde bereits allgemein über seine Zusammensetzung und in Kapitel III. 1.1.

über die Wirkung der einzelnen Komponenten berichtet. Hier soll nun speziell auf die Bestandteile eingegangen werden, die einen Einfluß auf das Auswachsen von Neuriten hatten.

Beim Vergleich der Faserbündel von Hühnchenretina-Explantaten, die in Standardmedium (II. 2.2.) mit und ohne Zusatz von Embryo-Extrakt (III.1.1.) kultiviert worden sind, wurden Unterschiede sowohl in der Wachstumsgeschwindigkeit als auch in der Morphologie gefunden. Im Medium ohne Embryo-Extrakt verlängerte sich die Zeit bis zum ersten Erscheinen von Neuriten in der Umgebung eines Explantats um einen halben bis einen Tag (vgl. Kapitel III.2.3.2., Seite 52). Darüber hinaus wuchsen auch die Fasern langsamer, nur etwa halb so schnell wie im Medium mit Embryo-Extrakt (vgl. III. 2.3.2., S. 53).

Ohne Zusatz von Embryo-Extrakt im Medium waren die Fasern in weniger, dafür dickeren Bündeln zusammengefaßt. Außerdem wuchsen die Explantate in 10-30 % der Fälle überhaupt nicht oder nur ganz geringfügig auf zweidimensionalen Kollagenschichten aus. Enthielt das Medium Embryo-Extrakt, so gab es nur 2-10 % nicht auswachsende Explantate.

Den gleichen Effekt wie Embryo-Extrakt hatten auch Medien, die mit Zellen von verschiedenen Hirnteilen konditioniert waren (s. III. 1.1.), und auch Zellrasen von Gliazellen als Wachstumsunterlage.

Neben der Zusammensetzung des Mediums beeinflußten auch das Volumen und die Häufigkeit des Medienwechsels das Auswachsen der Neurite. War das Volumen sehr gering, konnte zwar ein schnelleres Auswachsen als in größeren Mengen an Medium beobachtet werden, aber dafür wurde das Medium schon nach einem

Tag zu sauer (ca. pH 5), und die Fasern starben ab. Bei sehr großen Volumina dagegen verzögerte sich das Auswachsen der Fasern, es wuchsen weniger aus,und ihre Wachstumsgeschwindigkeit war geringer. Als Kompromiß wurde das kleinste Volumen an Medium ermittelt, bei dem der pH-Wert von 7,4 bis 7,2 ca. 2 Tage stabil war. Ein Milliliter war das geeignete Volumen für 2-5 mm^2 Retinagewebe von 0,2 mm Dicke. Nach groben Schätzungen entspricht dies einer Zellzahl in der Größenordnung von 10^6 pro Milliliter, oder anders ausgedrückt, das Volumen von Zellen zum Medium verhält sich ungefähr wie 1:1000.

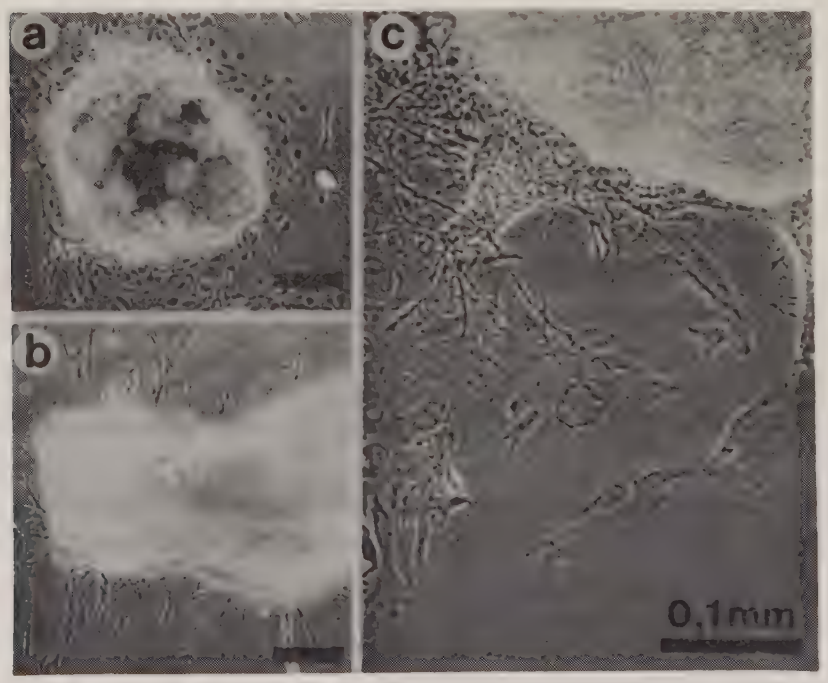


Abb.13 Retinaexplantate auf denaturiertem Kollagen (a und c) und auf ausgerichtetem zweidimensionalem Kollagen (b, Ablaufrichtung des Kollagens von oben nach unten). Bevorzugtes Auswachsen von Zellen anstelle von Neuriten

Um die Vorteile des schnelleren Auswachsens der Neurite in weniger Medium auszunutzen, wurde versucht, die zu rasche, schädliche Veränderung des Mediums - sichtbar an der Erniedrigung des pH - durch häufigeres Wechseln auszugleichen. Das führte aber dazu, daß kaum noch Fasern auswuchsen. Statt dessen bildete sich ein dichter Zellrasen nicht-neuronaler Zellen um die Explantate aus (Abb.13a). Offensichtlich fördert zu häufiger Medienwechsel das Wachstum der nicht-neuronalen Zellen, wobei die Neuriten bei der Kompetition um den freien Raum um das Explantat benachteiligt zu sein scheinen.

2.3.4. Das Überleben von Fasern aus Explantaten der embryonalen Hühnchenretina: Die weit ausgewachsenen Neuriten von Hühnchenretina-Explantaten starben meist zwischen dem 3. und 6. Tag nach dem Auspflanzen ab (Abb.14). Je eher, schneller und weiter die

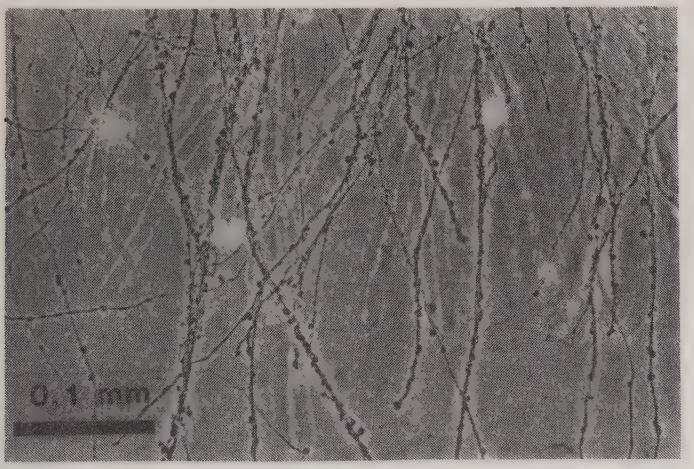


Abb.14 Degenerierende Retinaneuriten von Retinaexplantaten von 6 Tage alten Hühnchenembryonen nach 4 Tagen in Kultur. Im weiteren Verlauf der Degeneration würden sich die Fasern in einzelne Vesikel auflösen.

Fasern ausgewachsen waren, desto eher traten auch die ersten Degenerationserscheinungen auf. Wuchsen die Fasern verzögert aus, was bei denaturiertem Kollagen (s. III.2.3.2.) und in Medium ohne Embryo-Extrakt (s.III. 2.3.3.) der Fall war, überlebten die Fasern länger; die erreichte Gesamtlänge aber war meist geringer als unter Bedingungen, unter denen sie schneller auswuchsen. Auf Gliazellschichten als Wachstumsunterlage überlebten die Fasern länger als auf Kollagen oder poly-Aminosäuren, d.h. mindestens eine Woche.

Die oben genannten Zeiten bis zur Degeneration der Fasern gelten nur für die schnell und weit auf das freie Substrat ausgewachsenen Neuriten. In manchen Fällen konnte beobachtet werden, daß nach ca. 4-6 Tagen, nachdem die meisten langen Fasern schon degeneriert waren, neue Neuriten aus den Zellverbänden des Ex-

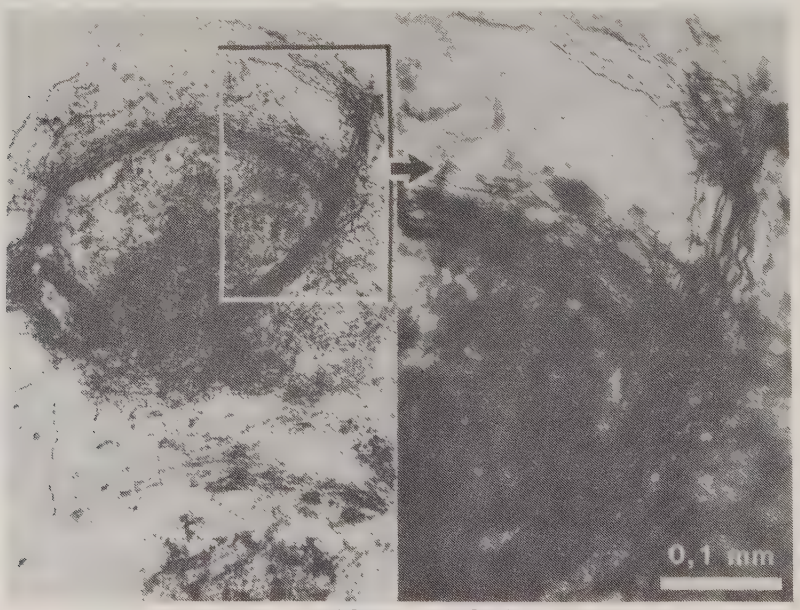


Abb.15 Mit Meerrettichperoxidase angefärbte Neuriten in einem Retinaexplantat 2 Wochen nach Explantation. Die Fasern haben im Schutze der Retinazellen viel länger überlebt als aus dem Gewebeverband ausgewachsene Fasern (s.Abb.14)

plantats herauswuchsen. Diese wuchsen aber langsamer und sehr viel weniger weit (ca. 0.2-0.5 mm) als die zuerst auswachsenden Neuriten. Diese Fasern wurden nicht weiter charakterisiert.

Mit Hilfe von Meerrettich-Peroxidase-Injektionen (siehe Kap. III. 2.4.) in Retinaexplantate konnten auch noch nach 2 Wochen in Kultur aktiv transportierende Faserbündel entdeckt werden. Ohne Färbung sah man sie gar nicht, da sie nicht vom Explantat weg auf das freie Substrat, sondern ringförmig innerhalb des Explantats gewachsen waren (Abb. 15). Die Ausschnittvergrößerung zeigt, daß die Fasern über weite Strecken parallel angeordnet sind.

Durch Umorientierung von Zellen der Retinaexplantate bildeten sich in einigen Fällen Zellhaufen heraus, die mit Faserbündeln untereinander in Verbindung standen. Injizierte man nach 1 bis 2 Wochen in Kultur, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, Meerrettich-Peroxidase in eine der Zellgruppen, so konnte das Enzym in den Fasern und benachbarten Zellgruppen nachgewiesen werden. Das bedeutet, daß sich zu dieser Zeit, zu der die primär ausgewachsenen Neurite bereits degeneriert waren, noch aktiv transportierende Fasern in der Kultur befanden.

2.3.5. Retinaexplantate in dreidimensionalem Kollagengeflecht:
In den vorigen Kapiteln wurde das Auswachsen von Fasern auf zweidimensionalen Unterlagen beschrieben. In einem dreidimensionalen Geflecht fibrillären Kollagens bildeten die Neuriten aus Explantaten der embryonalen Hühnchenretina ein völlig anderes Auswachsmuster aus als auf zweidimensionalen Unterlagen: nach einer Verzögerungsphase von ungefähr einem halben Tag (vgl. Kap. III. 2.3.2.) erschienen zunächst nur an wenigen Stellen

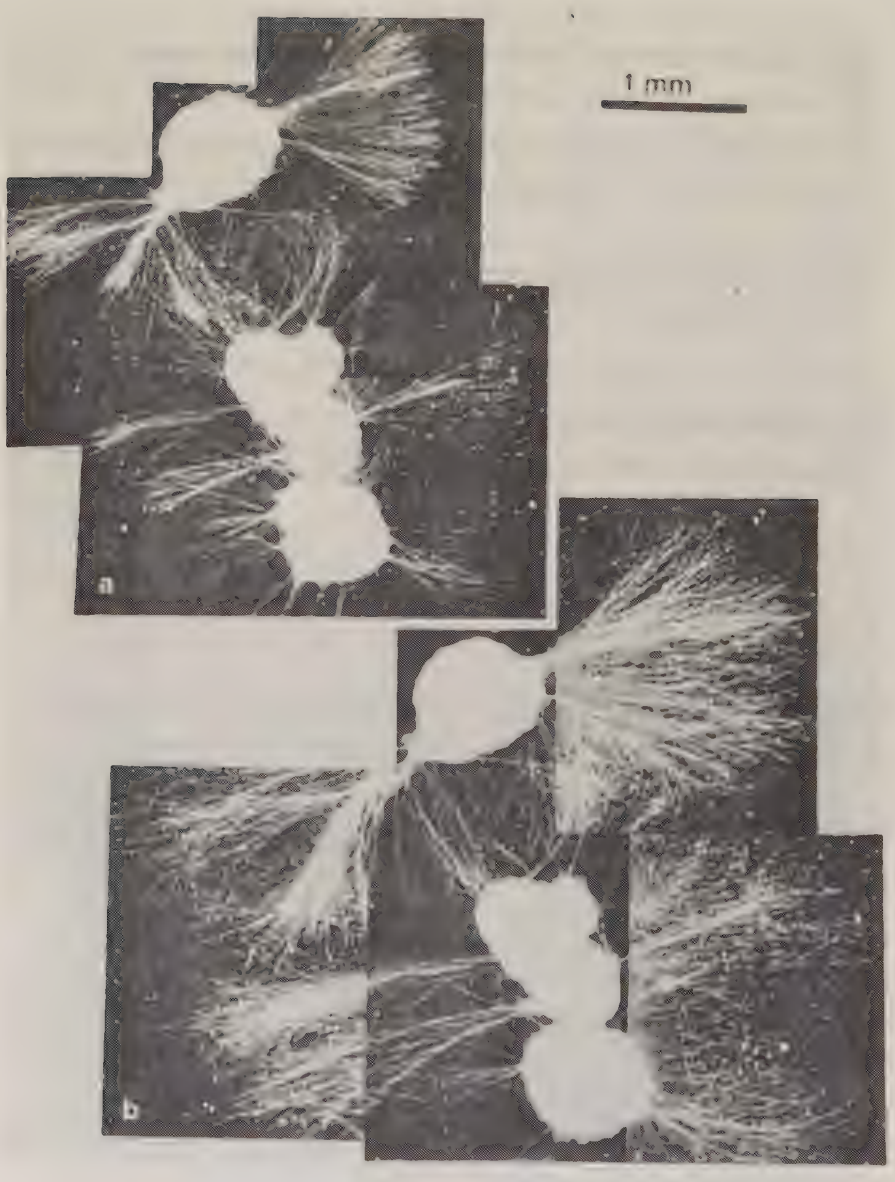


Abb.16 Retinaexplantate in dreidimensionalem Kollagengeflecht. Die zunächst dicken Faserbündel fächern sich in Einzelfasern auf. a) 2 Tage, b) 3 Tage in Kultur.

des Explantats dicke Bündel, die sich dann breit und weit in Einzelfasern auffächerten (Abb.16).

Wurden die Explantate unter Bedingungen kultiviert, unter denen auf zweidimensionalen Wachstumsunterlagen häufig flache Zellen anstelle von Fasern auf das Substrat auswuchsen (Medium ohne Embryoextrakt, höhere Serumkonzentration, häufiger Medienwechsel), war auch in dreidimensionalem Kollagen zelluläres Auswachsen zu beobachten; doch waren die Zellen langgestreckt und spindelförmig (Abb.17). Die Zellmorphologie ist ähnlich derjeniger von Zellen, die auch auf ausgerichtetem zweidimensionalem Kollagen wachsen (Abb.13b), während die entsprechenden Zellen auf ungerichtetem Substrat flach ausgebreitet sind (Abb.13a,c).

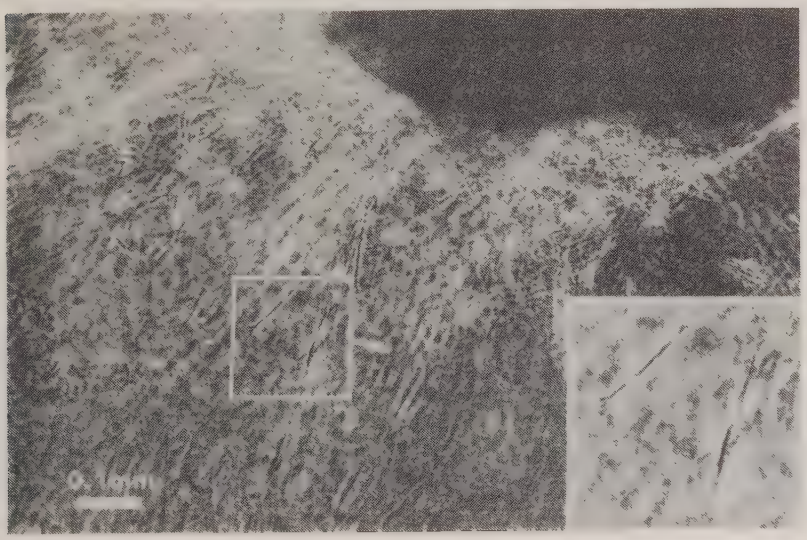


Abb.17 Retina explantate in dreidimensionalem Kollagengeflecht. Es wachsen bevorzugt Zellen mit spindelförmiger Gestalt aus anstelle von Neuriten.

2.4. Axonaler Transport von Meerrettich-Peroxidase: Verlauf von retinalen Fasern in Explantaten des Tektums

In auswachsenden Neuriten werden Bestandteile des Axoskeletts und Membranmaterial (nebst Mitochondrien zur Energieversorgung) anterograd in die Wachstumskegel transportiert; daneben werden Abbauprodukte und von außen aufgenommenes Material retrograd ins Perikaryon zurücktransportiert. Über die dafür verantwortlichen Transportsysteme wird auch Meerrettich-Peroxidase transportiert, welche mit Diaminobenzidin und Wasserstoffperoxid in ein licht- und elektronenabsorbierendes Reaktionsprodukt umgewandelt werden kann. So kann der Faserverlauf zwischen Nervenzellen - ohne Färbung zwischen anderen Zellen nicht zu erkennen - im Licht- und Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden.

Das Ziel der weiteren Untersuchung war es, den Verlauf von Neuriten zu verfolgen, die aus Explantaten der Retina in Gewebestückchen des optischen Tektums, aber auch aus Herz und Leber einwuchsen. Dabei versuchten wir herauszufinden, ob die embryonalen Retinafasern in vitro irgendeine neuronale Spezifität zeigten. In diesem Kapitel werden die in Tektumexplantate einwachsenden Fasern beschrieben; auf die Richtung des Auswachsens zu verschiedenen Zielgeweben wird im Kapitel "Versuche zur Chemotaxis" (III. 4.3.) eingegangen.

Mit der Peroxidase-Technik wurden in Tektumstücke als Zielgewebe einwachsende Retinaneuriten verfolgt, die im Abstand von einem halben bis ein Millimeter neben dem Retinaexplantat ausgepflanzt worden waren. Die Tektumexplantate waren Hühnerembryonen entnommen worden, die zwei Tage älter waren als die, von denen die Retinae stammten: damit hatten sie zum Zeitpunkt

des Auspflanzens bereits den Differenzierungsgrad, den sie auch in vivo beim Eintreffen der ersten Retinafasern haben. Nach zwei bis vier Tagen (in einigen Fällen auch nach zwei Wochen), wurde Meerrettich-Peroxidase in die Retinaexplantate injiziert. Eine optimale Kontrastierung der Fasern wurde dann erreicht, wenn die Peroxidase-Lösung langsam über einen Zeitraum von einigen Minuten injiziert wurde (II. 2.4.2.).

Die Auswertung der Präparate ergab, daß die meisten Fasern beim Erreichen des Zielexplantats ihre Richtung änderten und um das Explantat herumwuchsen. Wurden als Wachstumsunterlage dichte, fibrilläre Kollagenschichten (II. 2.3.4.b) verwendet, so verliefen die Fasern häufiger unter dem Explantat hindurch als ins Gewebe hinein. Dennoch wuchsen Fasern auch ins Tektumgewebe ein, und zwar unabhängig von seiner Orientierung: das Tektum wurde teilweise in 200µm breite Scheiben geschnitten (Gewebezerhacker,II.1.), so daß das Gewebestück mit seinen quergeschnittenen Schichten senkrecht auf die Unterlage zu liegen kam. Hierbei konnte sowohl die äußere Schicht des Tektums, das "Stratum opticum" (über das die Fasern normalerweise einwachsen) als auch die gegenüberliegende, ursprünglich dem Ventrikel angrenzende Schicht den Retinaexplantaten zugewandt werden. Breitere Stücke ließen sich entweder mit dem Stratum opticum auf das Kollagen oder umgekehrt auspflanzen. In keinem der vielen unternommenen Versuche wuchsen die retinalen Fasern bevorzugt von einer bestimmten Seite ins Tektumstückchen ein oder suchten im Explantat ein bestimmtes Gebiet auf. In Abb.18 werden zwei Beispiele für den Verlauf retinäler Fasern in Explantaten des Tektums gezeigt. Die Tektumexplantate waren mit ihrer Schichtung parallel zum Untergrund ausgepflanzt

worden (Stratum opticum unten). Ein und dieselbe Faser durchläuft viele Schichten im Tektum (verschiedene Fokusebenen bei hoher Vergrößerung).

Abb.18 Der Verlauf retinaler Fasern in Explantaten des Tektums. Die Fasern wurden mit Meerrettich-Peroxidase sichtbar gemacht. Die Zeichnung wurde mit einem Mikroskop mit Zeichentubus angefertigt.

3. Vergleich der Proteinzusammensetzung von Retinazellen und von isolierten Retinaneuriten

Für das Zustandekommen von Verschaltungen zwischen Nervenzellen werden Erkennungsvorgänge zwischen den präsynaptischen und postsynaptischen Elementen vorausgesetzt. Die auswachsenden Axone finden nicht nur ihr Zielgebiet, sondern dort auch die korrekte Position, den richtigen Zelltyp und darauf die richtige Stelle für einen Kontakt, nämlich die Dendriten. Auch wenn noch weitgehend unbekannt ist, ob die Mechanismen der Bahnfindung einerseits und der Zellerkennung andererseits chemischer und/oder physikalischer Natur sind, so handelt es sich doch um Wechselwirkungen zwischen den Wachstumskegeln am äußersten Ende der Axone und dem Substrat. Zum Verstehen dieser Wechselwirkungen könnte die Beantwortung der Frage beitragen, ob in Wachstumskegeln Moleküle vorkommen, die für sie besonders charakteristisch sind und im Zusammenhang mit der neuronalen Spezifität eine Rolle spielen.

Da einzelne Moleküle in situ nicht direkt nachgewiesen werden können, ist man auf indirekte Methoden angewiesen. Eine Möglichkeit besteht darin, Moleküle spezifisch zu markieren, zu isolieren und sie zu charakterisieren. Um Unterschiede zwischen zwei verschiedenen Kompartimenten von Nervenzellen vergleichen zu können, ist man auf Methoden angewiesen, mit denen man äußerst geringe Mengen (im Nanogramm-Bereich!) analysieren kann. Diese Voraussetzung ist durch die Weiterentwicklung und Verbesserung der zweidimensionalen Mikro-Gelelektrophorese durch Robert Neukirchen (1980) gegeben. Weiterhin benötigt man mit Wachstumskegeln angereichertes Material, das nicht durch Zellen "verunreinigt" ist;

eine Zelle hat ein vielfaches Volumen eines Wachstumskegels und könnte einen möglichen Unterschied verdecken. Retinaexplantate, die auf nativem Kollagen in Embryo-Extrakt-haltigem Medium 2 Tage lang kultiviert worden sind (vgl. Abb.10b), zeigten ein so intensives Auswachsen von Neuriten, daß durch Abschneiden und Isolieren des vorderen Teils der Neuriten genügend Material für eine zweidimensionale Analyse gesammelt werden konnte.

Zur Markierung von neu synthetisierten Proteinen wurde das Kulturmedium durch methioninfreies Medium ersetzt und darin 0,1 mCi ^{35}S-Methionin pro Milliliter und Schale zugegeben (II.2.4.1.). Da ein Tag später die Degeneration der Fasern weit fortgeschritten war im Vergleich zu denen von Kontroll-Explantaten, wurde zunächst untersucht, ob und wie schnell die radioaktive Aminosäure überhaupt aufgenommen und in Proteine eingebaut worden war. Dazu wurde aus einer Schale nach 1', 10', 20', 30', 40', 2.5 h und 10 jeweils ein Explantat (0,5 x 0,5 mm) entnommen, gewaschen und in lösliches (Überstand) und mit Trichloressigsäure fällbares Material aufgetrennt. In Abb.19 ist die Radioaktivität im Überstand, im Präzipitat und als Kontrolle die von einem Mikroliter ^{35}S-Methionin-haltigem Medium (1 ml entspricht ungefähr dem zwanzigfachen Volumen eines Explantats) eingetragen. Die Radioaktivität im löslichen Überstand des Zellextrakts erreicht nach ca. 2 Stunden ein Plateau, d.h. 2 Stunden nach Zugabe des Methionins zum Medium ist der Gleichgewichtszustand zwischen löslichem Methionin in den Zellen und im Medium erreicht. Im Präzipitat steigt die Radioaktivität während des untersuchten Zeitraums von den ersten Minuten bis 10 Stunden exponentiell an. Daraus kann man schließen,

daß zumindest für den untersuchten Zeitraum genügend Methionin für den Einbau vorhanden war und die Radioaktivität keine so starke zytotoxische Wirkung ausübte, daß etwa die Proteinsynthese sofort blockiert worden wäre.

Wir verglichen Material, das viele Wachstumskegel enthielt, mit möglichst von Neuriten befreiten Explantaten. Dazu wurden die Neuriten unter lichtmikroskopischer Kontrolle mit einem Ra-

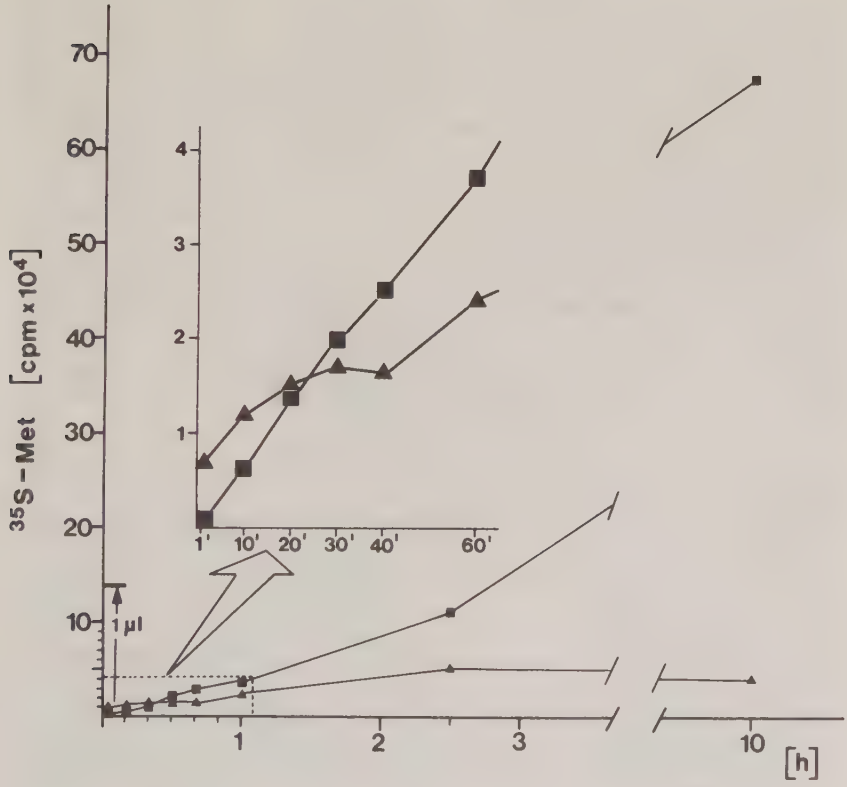


Abb.19 Aufnahme von ^{35}S-Methionin in Hühnchenretina-Explantate (▲—▲) und Einbau in Proteine (■—■) in Abhängigkeit von der Zeit. Unten rechts ist die Radioaktivität von 1µl ^{35}S-Methionin-haltigem Medium eingetragen. Der Anfang der Kurve ist mit geändertem Maßstab herausvergrößert.

sierklingensplitter kurz hinter der Wachstumsfront, an der sich die meisten Wachstumskegel befanden, abgeschnitten und mit einer Kapillare aufgesammelt, wie es in Kapitel II. 2.4.1. beschrieben ist.

Probe 1 bestand aus dem Sammelgut von ca. 16 Explantaten; Probe 2 war ein von den sichtbaren Neuriten befreites Explantat, das zur Angleichung der Konzentration an Probe 1' (Radioaktivität) vor der Elektrophorese noch 1:10 verdünnt werden mußte. Die zweidimensionale Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Robert Neukirchen durchgeführt. Das Material wurde unter Anwesenheit von Magnesium-Ionen (Stabilisierung der Membranpartikel) und Nukleasen homogenisiert, die Bestandteile des Gemisches gemäß ihrer Ladung elektrophoretisch getrennt (isoelektrische Fokussierung = erste Dimension) und dann unter denaturierten Bedingungen nach Molekulargewicht aufgetrennt (SDS-Gelelektrophorese = zweite Dimension). Die Gele wurden getrocknet und 14 Tage lang auf einem Röntgenfilm (Kodak Royal X-omat) exponiert. Die Proteinmenge auf den Gelen war so gering, daß sie durch Anfärbung mit Coomassie-Blue nicht sichtbar gemacht werden konnte. Mit Autoradiographie jedoch ließen sich die Proteine nachweisen. Die Autoradiogramme der Gele sind in Abb.20 dargestellt. Obwohl die einzelnen Flecken bislang noch nicht identifiziert worden sind, kann doch ein Unterschied im Proteinmuster festgestellt werden. Auffallend sind die Unterschiede der Flecken links im Bild, was dem sauren Bereich entspricht.

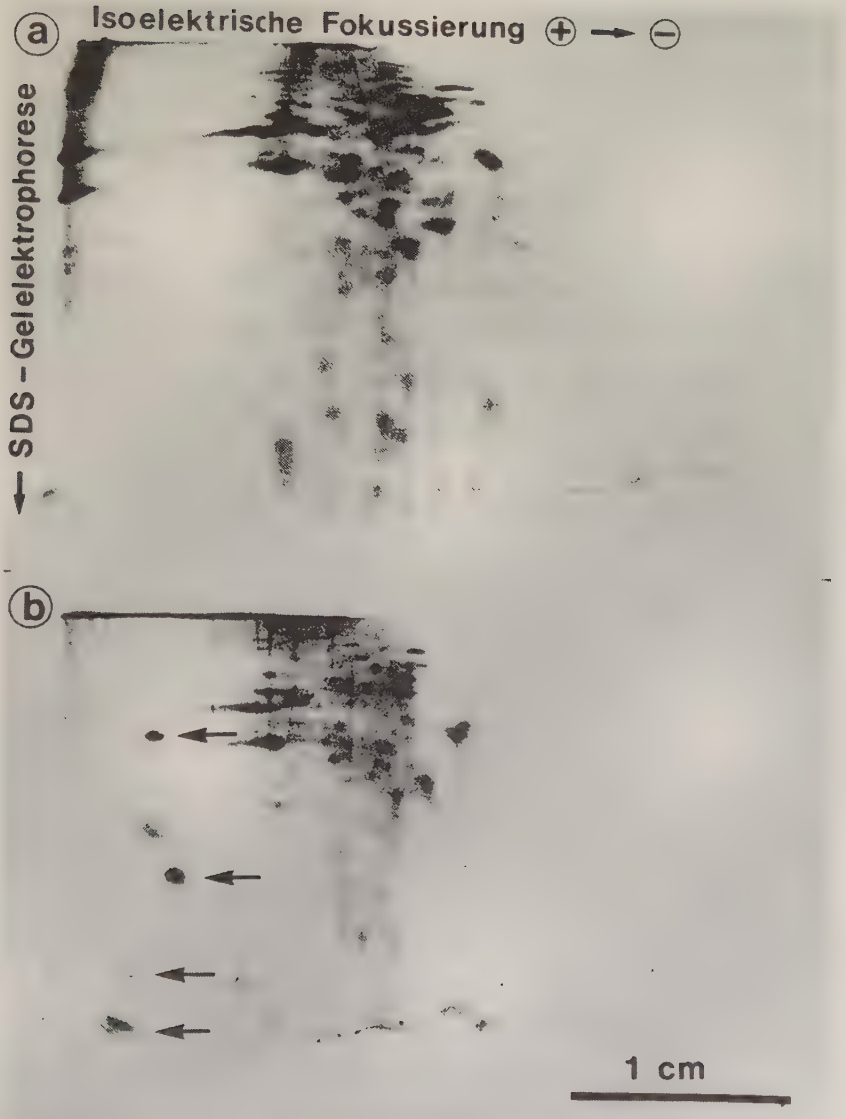


Abb.20 Autoradiogramme von Gelen der zweidimensionalen Mikroelektrophorese, die das Muster der ^{35}S-Methionin-markierten Proteine zeigen. a) Zellkörper, b) Wachstumskegel-angereichertes Material von Hühnchenretina-Explantaten. Die Pfeile weisen auf Unterschiede im sauren Bereich

4. Orientierung der Fasern

In den vorigen Kapiteln wurden Retinaexplantate von Hühnerembryonen beschrieben, die starkes Auswachsen von Fasern zeigten. Diese Eigenschaft bietet die Möglichkeit, nach Parametern zu suchen, die die Auswachsrichtung von Fasern beeinflussen. Solche Parameter könnten physikalischer und/oder chemischer Natur sein. Während im ersten Fall die Führung der Fasern rein mechanisch in Bahnen erfolgte,wie P.Weiss (1941, 1955) es mit seiner Theorie der Kontaktführung beschrieb, würden sich im zweiten Fall die Fasern nach chemischen Gradienten ausrichten (Crick, 1971). "In vitro"-Versuche mit Nervenzellen des peripheren Nervensystems (sympathische Ganglien von Hühnerembryonen) scheinen sowohl für eine mechanische Führung (z.B. Ebendal, 1976a)als auch für eine chemische Führung (Chamley, 1973; Ebendal und Jacobson, 1977) zu sprechen. In der vorliegenden Arbeit wird das Verhalten von Retinaneuriten beschrieben, die zu Fasern des zentralen Nervensystems zählen.

4.1. Mechanische Führung von Neuriten

Wachsen Neuriten auf Substrat mit orientierter Oberfläche aus, folgen sie der Orientierung im Substrat (Kontaktführung; Weiss, 1961). Weiter kann die Wachstumsrichtung durch Wechselwirkung der Fasern untereinander bestimmt werden (Kontakthemmung; Dunn, 1971): Läuft gelöstes Kollagen von entsprechend vorbehandelten Schalenböden durch Kippen der Schalen ab (s. Kap.II. 2.3.4.c), so bildet sich eine Schicht von Kollagenfibrillen mit einer Vorzugsrichtung aus. Obwohl die Kollagenfasern bei hoher Vergrößerung im Raster-Elektronenmikroskop eher wie ein ungeordnetes Netzwerk aussahen, richteten sich

auswachsende Faserbündel streng nach der Ablaufrichtung des Kollagens. Dabei zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß des Auswachsens und dem entstehenden Fasermuster: bestanden die Bündel aus wenigen Einzelfasern, was auf eine hohe Affinität zum Substrat schließen läßt (s.Kap.III. 3.2.2.), so schwenkten sie schnell und genau parallel zur Ablaufrichtung des Kollagens ein (Abb.21a); dicke und sich oft überkreuzende Bündel dagegen waren weniger streng ausgerichtet (Abb.21b). Manchmal waren die Kollagenschichten nicht gleichmäßig ausgebildet: wurde das Kollagen zu schnell fest, so bildeten sich im Lichtmikroskop (Phasenkontrast) sichtbare Schlieren im

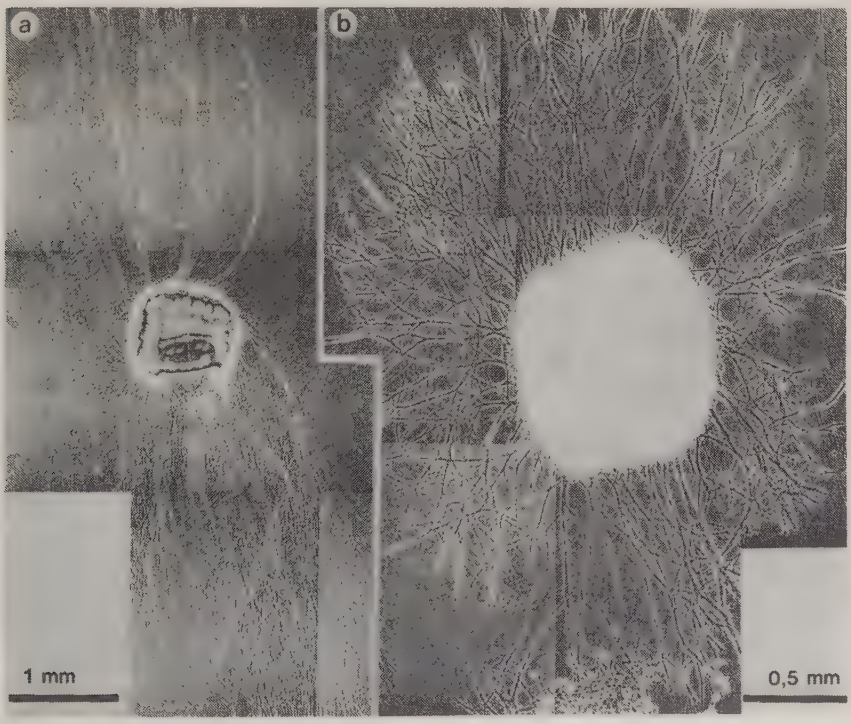


Abb.21 Retinaexplantate von 6 Tage alten Hühnchenembryonen auf ausgerichtetem, fibrillärem Kollagen (Ablaufrichtung des Kollagens von oben nach unten). a) Strenge Ausrichtung der vielfach einzeln wachsenden Neuriten (3 Tage in Kultur); b) wenig Ausrichtung der Faserbündel, die sich oft überkreuzen (2 Tage in Kultur).

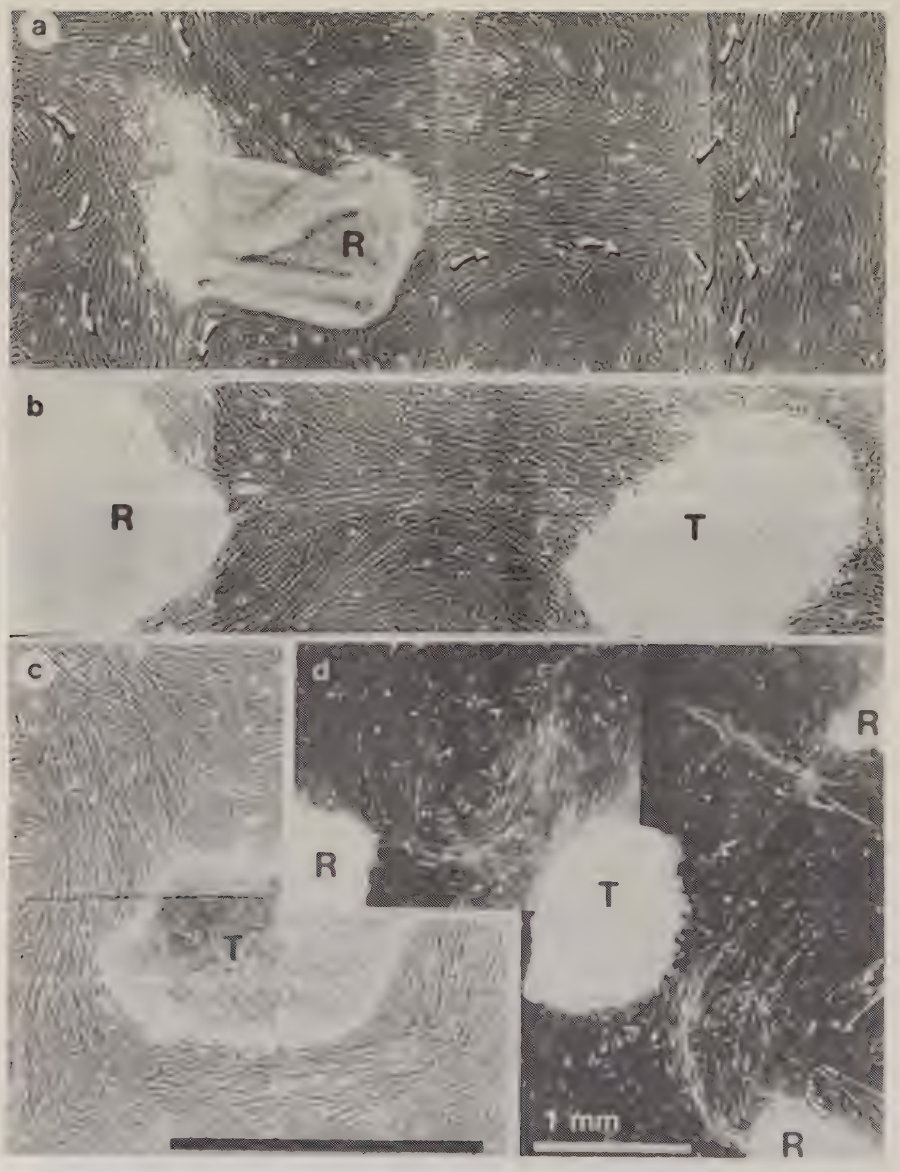


Abb.22 Retina- und Tektumexplantate von Hühnchenembryonen auf Zellrasen von Gliazellen des optischen Nerven der Ratte. Die Retinafasern wachsen immer parallel zur Längsachse der Untergrundzellen. a) Verlauf von sowohl der Längsachse der Zellen des Untergrunds als auch der Retinafasern durch Pfeile hervorgehoben. b) Retinafasern "treffen" ein Tektumexplantat; c) u. d) Retinafasern "meiden" Tektumexplantat. R = Retinaexplantat, T = Tektumexplantat

Kollagen aus. Wuchsen nun Retinaneuriten auf solchen Strukturen, änderten sie mit teilweise sehr engem Radius ihre Richtung, um in Längsrichtung der Schlierenstrukturen einzuschwenken (Abb.24b).

Gliazellen des optischen Nerven von Ratte und Maus bildeten auf einer festen Unterlage Zellrasen aus (Herstellung s. Kap. II. 2.1.2.), wobei sich ab einer bestimmten Zelldichte (subkonfluenter Monolayer) die einzelnen Zellen parallel zu ihren Längsachsen anordneten. Aus Retinaexplantaten auswachsende Fasern wuchsen auf solchen Zellschichten parallel zur Längsachse der Untergrundzellen aus. In Abbildung 22a ist diese Richtung mit Pfeilen gekennzeichnet. Die nach rechts im Bild ausgewachsenen Fasern haben in ungefähr 1 mm Entfernung ihre Richtung nach zwei Seiten um ca. 90° geändert, um parallel zu den Zellen des Untergrunds einzuschwenken. Während in Abb.22b die Zellen so angeordnet sind, daß die vom Retinaexplantat ausgewachsenen Fasern beim Folgen ihrer Längsrichtung auf das Tektumexplantat zuliefen, wurden die Fasern in Abb.22c und d an den Explantaten vorbeigelenkt.

Eine Orientierung der Fasern wurde auch erreicht, wenn Linien in die Böden von Plastikschalen eingraviert wurden, wie Campenot (1977) es beschrieben hatte. Die parallelen Kratzer mit einem

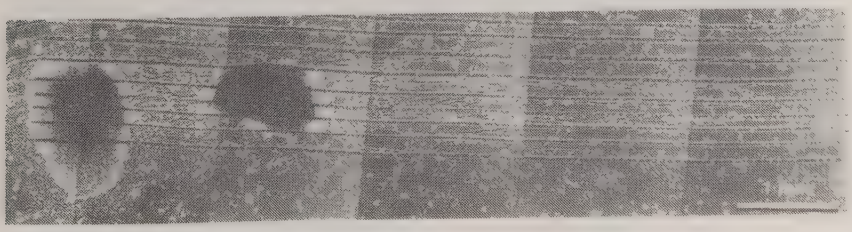


Abb.23 Orientierung retinaler Fasern durch Kratzspuren im Schalenboden (beschichtet mit denaturiertem Kollagen). Die Fasern sind innerhalb dieser "Barrieren" über 5 mm weit gewachsen (4 Tage in Kultur). Links im Bild ein Tektumstück als Zielexplantat für die Retinafasern.

Abb.24 Retinaexplantate auf zweidimensionalem fibrillärem Kollagen 1,5 Tage in Kultur. a) Durch Kontakthemmung aufgefächertes Faserbundel; b) durch Kontaktführung an Kollagenstrukturen abgelenkte Fasern

relativ weiten Abstand von ungefähr 200µm sind nicht als Strukturen für eine Kontaktführung zu verstehen, sondern eher als Führungslinien im Sinne von Barrieren, die von Faserbündeln nur selten überschritten wurden. Inn Abb.23 sind Fasern 5 mm weit parallel zwischen den Kratzern im Untergrund gewachsen.

In Abb.24a ist ein Faserbündel auf ungerichtetem, fibrillärem Kollagen abgebildet, das sich gleichmäßig, fächerförmig ausbreitet. Das Auswachsmuster hier hängt nicht von dieser Strukturierung des Substrats ab, sondern ist auf Wechselwirkungen der Fasern untereinander zurückzuführen - ein Verhalten, das mit der von Dunn (1971) beschriebenen Kontakthemmung übereinstimmt.

Am Verlauf der Neuriten in Abb.25 wird besonders deutlich, daß sowohl Kontaktführung als auch Kontakthemmung das Auswachs-

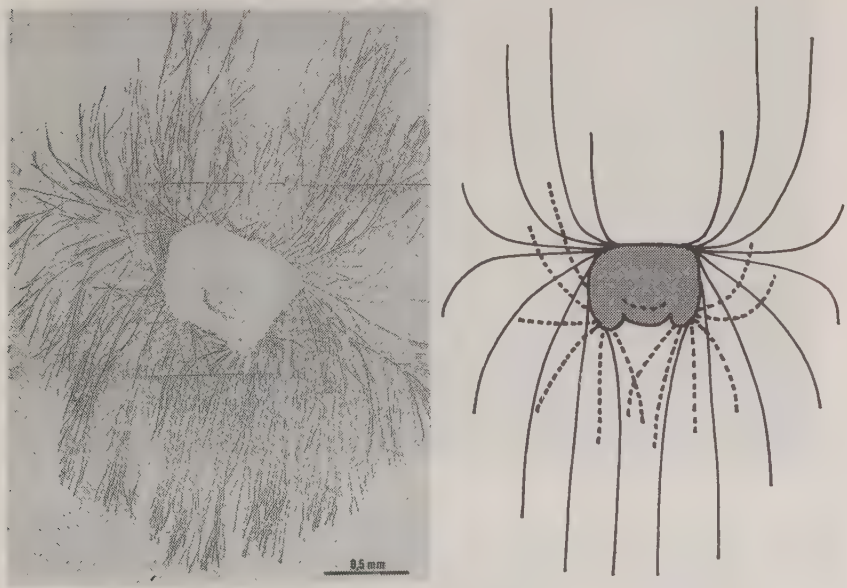


Abb.25 Faserverlauf von Retina neuriten auf orientiertem zweidimensionalem Kollagen; 2 Tage in Kultur. Im Schema rechts sind die später ausgewachsenen Fasern gestrichelt gezeichnet.

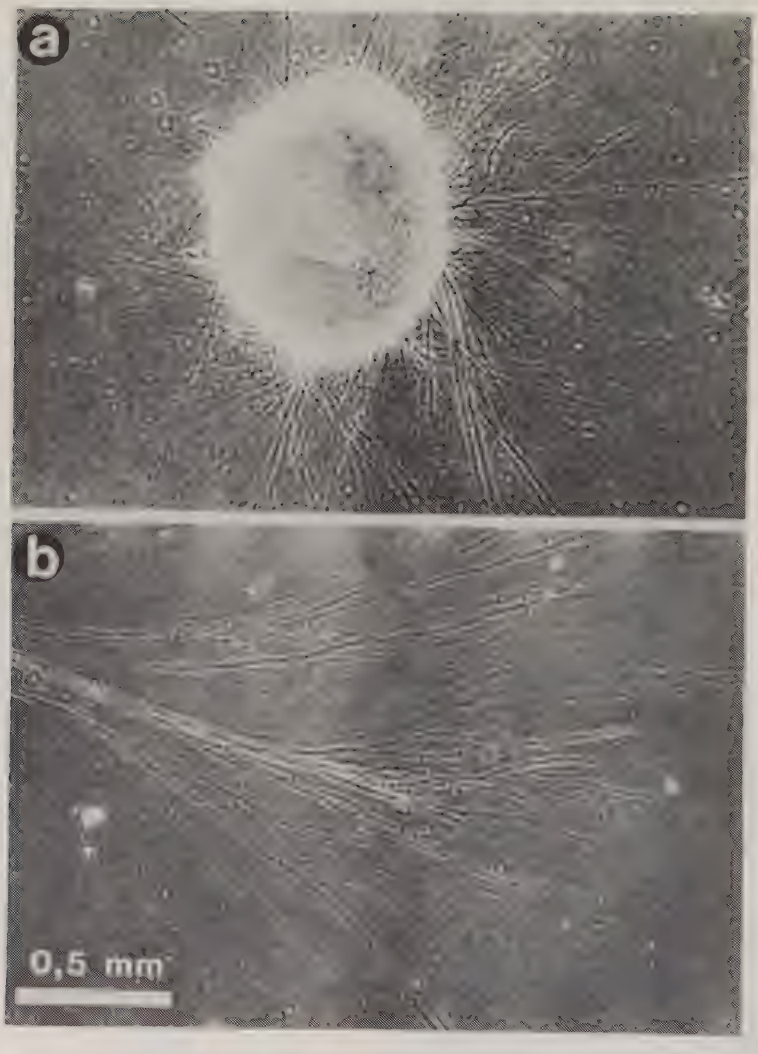


Abb. 26 Retinaneuriten in dreidimensionalem, fibrillärem Kollagen. a) Geradliniger Faserverlauf bei geringer Dichte des Auswachsens; b) Auffächern eines Faserbündels

muster beeinflussen: einerseits schwenken die Faserbündel parallel zur Ablaufrichtung des Kollagens ein und andererseits fächern sich die Bündel auf, um einen größeren Abstand voneinander einzunehmen. Dabei zeigt sich, daß die zu verschiedenen Zeiten ausgewachsenen Fasern (im Schema sind die zuerst ausgewachsenen durchgezogen und die später ausgewachsenen gestrichelt gezeichnet) dieses Muster unabhängig voneinander ausgebildet haben.

Das Phänomen der Kontakthemmung zeigt sich auch am Verhalten von Fasern in dreidimensionalem Kollagengeflecht: während bei sehr geringer Dichte des Auswachsens die Fasern geradlinig verlaufen (Abb.26a), fächert sich ein zunächst dichtes Bündel divergent in Einzelfasern auf (Abb.26b; vgl. auch Abb. 16).

Eine weitere Beobachtung eines orientierten Auswachsens, dessen Muster nicht auf Substratstrukturen zurückzuführen war, wurde an Kulturen von Retinastreifen gemacht. Das Ziel war, Retinaexplantate so auszupflanzen, daß die ursprünglichen Achsen im Tier und die Lage in der Retina rekonstruierbar waren. Dazu wurden Retinae auf schwarze Millipore-Filter ausgebreitet und beides zusammen senkrecht zur optischen Fissur mit dem Tissue-Chopper in 300µm breite Streifen geschnitten (Kap. II. 2.1.1.). Die Streifen konnten dann mit Hilfe einer Pinzette bequem mit dem Gewebe nach unten auf das Kollagen übertragen werden. Da beim Ausbreiten der Retina die Außenseite, d.h. die Photorezeptorschicht, auf den Filter gebracht worden war, lag nun die Ganglionzellschicht dem Kollagen zugewandt. (Die Idee, Retinae an schwarze Millipore-Filter zu adsorbieren, um gezielt definierte Teile der Retina zu erhalten,

stammt von R.Neukirchen (persönl. Mitt.). Die Kultivierung dieser Streifen und die ersten Beobachtungen wurden in Zusammenarbeit mit F.Bonhoeffer, H.-H. Epperlein, W. Halfter und J. Huf durchgeführt.) Aus Streifen längs zur anteroposterioren Achse aus dem dorsalen und mittleren Teil der Retina wuchsen die Fasern wesentlich zahlreicher und weiter nach ventral aus als nach dorsal (bezogen auf die ursprüngliche Achse im Tier) (s. Abb.27 u. 29). Dabei waren die Fasern ventral um einen stumpfen Winkel hin zu einer Achse senkrecht zur Mitte des Explantat-Streifens geneigt, dorsal dagegen von dieser Mittelachse weg. Die Streifen aus dem ventralen Teil der Retina wuchsen insgesamt zwar weniger stark aus als die mehr dorsal gelegenen, aber die Orientierung war genau umgekehrt: es wuchsen mehr Fasern nach dorsal und hin zur Mittelachse aus. Die beobachteten Richtungen entsprechen grob der Verlängerung des Faserverlaufs innerhalb der Explantate, der in situ auf die optische Fissur zu ausgerichtet ist. Auch dieses Verhalten der Fasern, ihre ursprüngliche Richtung über eine Distanz von 1 bis 2 mm beizubehalten, ist möglicherweise mit dem Phänomen der Kontakthemmung zu erklären (darauf wird in der Diskussion eingegangen).

4.2. Unterschiede zwischen anterioren und posterioren Retinaneuriten

Von W. Halfter (pers.Mitt.) wurde beobachtet, daß Membranfraktionen des optischen Tektums bevorzugt an die anterioren Fasern von Retinaexplantaten anhafteten (Abb.27b). Deshalb erschien es interessant, nach morphologischen und physiologischen Unterschieden zwischen anterioren und posterioren Fasern zu suchen. Die Auswertung wurde durch die Tatsache

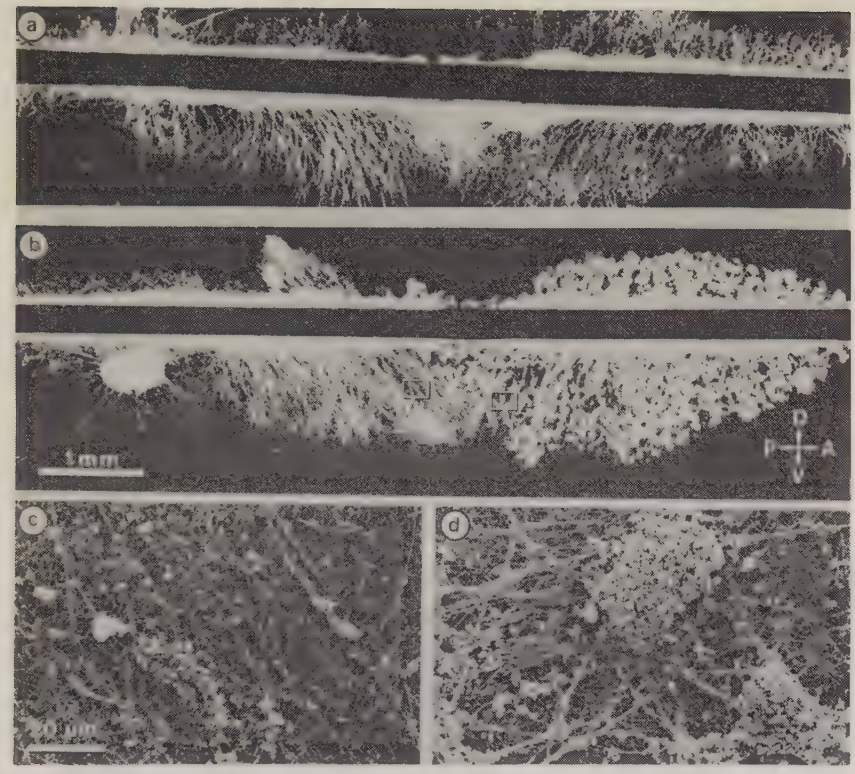


Abb.27 Retinastreifen auf fibrillärem Kollagengeflecht; 2 Tage in Kultur. Die ursprünglichen Achsen im Tier sind in b) links unten angegeben: A anterior, V ventral, P posterior, D dorsal. a) Kontrollexplantat; b) Aggregate einer Membranfraktion des Tektums haften nur an den anterioren Fasern (a und b Dunkelfeldbeleuchtung); c) und d): die in b) eingezeichneten Ausschnitte nach "Kritischer-Punkt"-Trocknung im Raster-Elektronenmikroskop; d) dicke Membranaggregate haften an den anterioren Fasern.

erschwert, daß die Morphologie der Fasern von vornherein von Kultur zu Kultur etwas verschieden wär, obwohl versucht wurde, alle Versuchsparameter konstant zu halten. Einige der im Folgenden beschriebenen Befunde deuten darauf hin, daß anteriore und posteriore Fasern nach verschiedenem Muster auswachsen.

In einigen unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen wurde beobachtet, daß anteriore Fasern bevorzugt an der Oberfläche des Kollagens wuchsen, während die posterioren in tieferen Ebenen zu finden waren. Dies könnte erklären, warum Membranklumpen nur an anterioren Fasern zu finden sind: nur sie wären vom freien Medium her zugänglich. Weitere Untersuchungen jedoch ergaben, daß die Fasern sowohl anterior als auch posterior bevorzugt an der Kollagenoberfläche wuchsen,

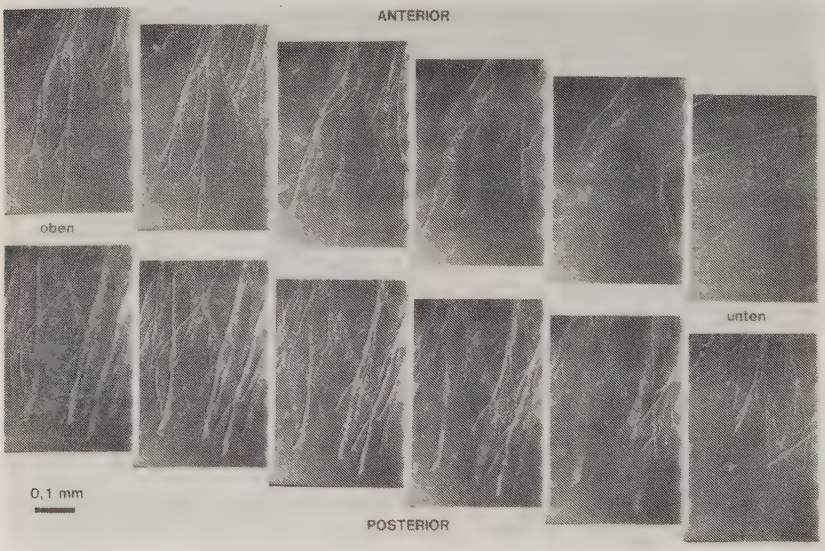


Abb.28 Fokus-Serie von anterioren (oben) und posterioren (unten) Faserbündeln in fibrillärem Kollagengeflecht von ca. 0,5 mm Dicke (Differential-Interferenz-Kontrast.

darüber hinaus aber posterior auch in tieferen Schichten. Diese Beobachtungen wurden im Differential-Interferenz-Kontrast durchgeführt (Abb.28; Vorteile: durch geringe Tiefenschärfe keine Störung durch Objektstrukturen in anderen Fokusebenen).Auch im Raster-Elektronenmikroskop konnte kein Unterschied in der Anzahl der von der Oberfläche her sichtbaren und damit den Membranvesikeln zugänglichen Fasern festgestellt werden (Abb.27c und d; Abb.30c und d). Daher nehmen wir an, daß die freie Zugänglichkeit der Fasern für die Membranvesikel nicht als Erklärung für das unterschiedliche Anheften dienen kann.

In der Morphologie der Faserbündel konnten folgende Unterschiede zwischen anterior und posterior gefunden werden: (i) in mehr als der Hälfte aller beobachteten Fälle waren die posterioren Fasern deutlich länger ausgewachsen als die anterioren (Abb.29), nie aber umgekehrt; (ii) ebenfalls in mehr als der Hälfte der Fälle waren Fasern posterior über eine längere Strecke geradlinig gewachsen als anterior (Abb.30), nie umgekehrt; (iii) die posterioren Faserbündel waren ge-

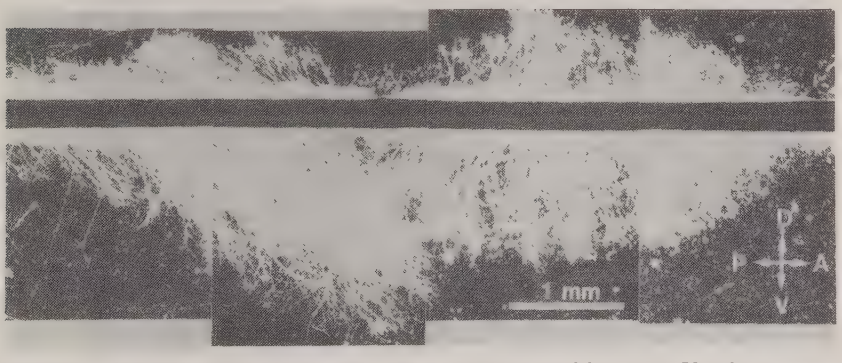


Abb.29 Retina-Streifen auf fibrillärem Kollagengeflecht, 2 Tage in Kultur; Orientierung wie in Abb.27.

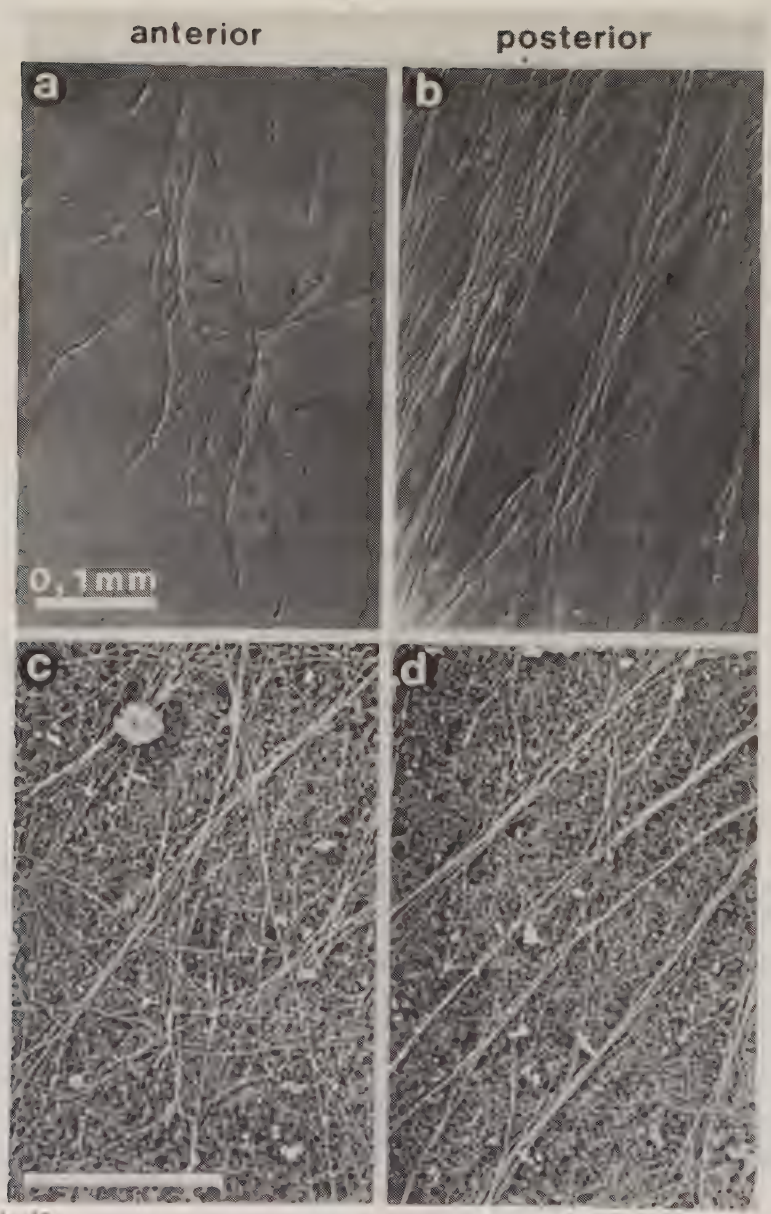


Abb. 10 Anteriore (links) und posteriore (rechts) Faserbündel auf bzw. in fibrillärem Kollagen; a) und b) im Differential-Interferenz-Kontrast; c) und d) im Raster-Elektronenmikroskop nach "Kritischer-Punkt"-Trocknung.

ordneter als die anterioren, d.h. in einem Bündel verliefen mehr Fasern parallel zueinander, und auch mehr Bündel waren untereinander parallel angeordnet (Abb.29, 30). Diese Unterschiede wären durch verschiedene Affinitäten der Fasern untereinander und der Fasern zum Substrat zu erklären: Die anterioren Fasern hätten eine größere Affinität zum Substrat als die posterioren Fasern.

4.3. Versuche zur Chemotaxis

Um zu untersuchen, ob Tektumstückchen in den Explantatkulturen eine chemotaktische Wirkung auf Retinafasern ausüben, wurde in über hundert Versuchsansätzen und über tausend Einzelsituationen das Auswachsen von Fasern aus Retinaexplantaten verfolgt, denen im Abstand von 0,5-1 mm andere Explantate gegenübergepflanzt worden waren. Meistens dienten Stücke des optischen Tektums 8 Tage alter Hühnerembryonen ohne weitere Zuordnung als Zielexplantate; in ca. 30 Fällen wurden Explantaten der dorsalen Retina Stücke des ventralen Tektums und umgekehrt angeboten, und mindestens ebenso oft wurde die Lage der Schichtung im Tektum berücksichtigt, so daß teils die Außenseite (Stratum opticum), teils die dem Ventrikel zugewandte Schicht dem Retina-Explantat gegenüberlag. Außerdem wurden Herz- und Leber-Explantate von 10 Tage alten Hühnerembryonen als Ziele angeboten. Das Ergebnis der Beobachtungen war übereinstimmend, daß die Fasern unabhängig von der Nähe eines Zielexplantats ihre Richtung, die je nach Unterlage eventuell durch Substratstrukturen beeinflußt wurde (siehe Kap.III. 4.1.), beibehielten und nicht etwa darauf zuliefen. Darüber hinaus wuchsen häufig Faserbündel, deren Wachstum zunächst auf das Zielgewebe ausgerichtet war, um das Explantat

herum. In Zeitrafferfilmen wurden einige am Zielgewebe ankommende Fasern verfolgt: als erstes stießen sie auf Zellen, die aus dem Zielexplantat herausgewachsen waren und einen mehr oder weniger breiten Gürtel ausbildeten. Meist konnten die Fasern nach Erreichen dieser Zellen ohne Färbung nicht weiter verfolgt werden; in einem Fall aber wurde offensichtlich, daß sowohl die als erstes berührte Zelle als auch die auswachsende Faser auf diesen Kontakt reagierten. Während sich die Zelle abrundete, zog sich die Faser wiederholt zurück und nahm schließlich einen anderen Weg (vgl. auch die Wechselwirkung von Fasern mit einer Zelle im Zeitrafferfilm in Abb.12d-f). Diese Art von Kontakthemmung ist möglicherweise die Ursache dafür, daß von den vielen Fasern, die ein Zielgewebe erreichen, nur sehr wenige in das Explantat auch einwachsen.

Um zu erfahren, ob die Retinaneuriten ein chemotaktisches Verhalten zeigen, wurden außerdem in Kulturschalen Gradienten von Tektumextrakt und Nerven-Wachstums-Faktor (III. 1.1.) aufgebaut. Dazu wurden entsprechend gefüllte Kapillaren in Form eines Dreibeins in Kulturschalen mit Retinaexplantaten in dreidimensionalem Kollagen gestellt, so daß sich ihr Inhalt durch Diffusion verteilen konnte. Wie sich ein solcher Gradient aufbaute und aufrecht erhalten blieb, konnte mit Hilfe von Kontrollkapillaren, die mit dem Farbstoff Evan's Blue gefüllt waren, an der unterschiedlichen Farbintensität erkannt werden. War die Öffnung der Kapillare zu klein oder verlief sie parallel zum Schalenboden, so konnte nach einer Stunde kaum noch Farbaustritt beobachtet werden. Daher wurden schräg abgeschnittene Kapillaren mit größeren Öffnungen (Ø etwa 0,5 mm) benutzt. Um diese bildete sich eine Diffusionswolke mit hoher

Farbintensität aus, die mit zunehmender Entfernung blasser wurde. Sowohl die Größe der Farbwolke als auch ihre Farbintensität änderten sich in den folgenden Stunden nicht wesentlich. Die Kapillaren waren mit einer Nervenwachstumsfaktor-Lösung (5000 bzw. 500 Biologische Einheiten pro Milliliter, das entspricht also 50 bzw. 5 pro Kapillare) angefüllt (nach Literaturangaben sind 1-5 Biologische Einheiten bei Neuronen des peripheren Nervensystems optimal wirksam). Andere Kapillaren waren mit dem unverdünnten Überstand homogenisierter Tekta acht Tage alter Hühnerembryonen mit Trasylol-Zusatz zur Inaktivierung von Proteasen angefüllt. Das Ergebnis dieser Versuche war, daß in keiner von 12 ausgewerteten Schalen mit über 50 Explantaten ein verstärktes Auswachsen in Richtung Kapillare oder von ihr weg häufiger als zufällig zu beobachten war. Auch konnte nie ein Einschwenken von Fasern in Richtung Gradientenquelle festgestellt werden.

Ein weiterer Versuch, ein mögliches chemotaktisches Verhalten von Retinaneuriten aufzudecken, bestand darin, Explantate zwischen Kollagenschichten unterschiedlicher Qualität auszupflanzen (Schema Abb.31). Zur "Verbesserung" der Qualität wurde Embryo-Extrakt, dessen positiver Einfluß auf Kulturen in Kap. III. 1.1. beschrieben wurde, und Ganglioside (diese wirken bei einer neuronalen Zellinie als Überlebens- und Differenzierungsfaktor; Morgan und Seifert, 1979) hinzugefügt. Dazu wurden in jeweils drei Schalen zunächst die untere Kollagenschicht des Typs A (ohne Zusatz), B (mit Embryo-Extrakt) und C (mit Gangliosiden) gegossen und nach einer halben Stunde die Explantate aufgelegt. Nach

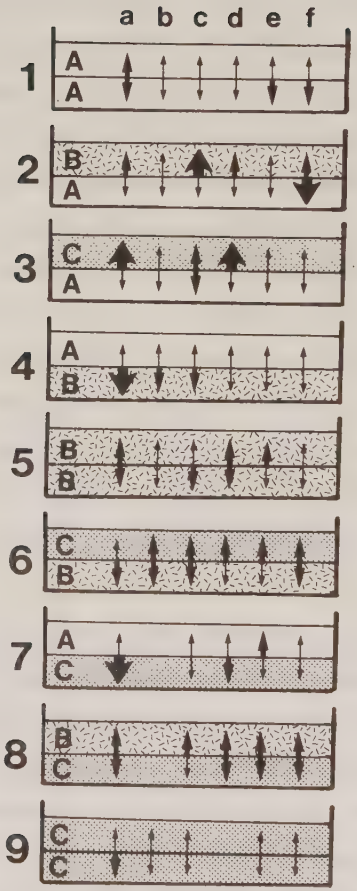


Abb.31 Schematische Darstellung von 9 Kulturschalen, in denen jeweils 6 Retinaexplantate (a-f) zwischen Kollagenschichten verschiedener Qualität ausgepflanzt worden waren: A Kollagen ohne Zusatz; B Kollagen mit Embryo-Extrakt; C Kollagen mit Gangliosiden. Die Pfeildicke ist ein Maß für das Auswachsen von Neuriten in die jeweiligen Kollagenschichten.

drei Stunden Anheftungszeit wurden die entsprechenden Kollagensorten überschichtet. Ihre Anordnung und die Auswachsrichtung der Fasern von jeweils sechs Explantaten zwei Tage nach dem Ansetzen ist in Abb.31 zu sehen. Das Ergebnis in Zahlen ausgedrückt lautet: 31 der 51 Explantate von allen Schalen bzw. 19 von 34 Explantaten der Schalen mit unterschiedlichem Kollagen zeigten keine Vorzugsrichtung des Auswachsens. Von den 23 Explantaten der Schalen 2, 3, 4 und 7 wuchsen 9 bevorzugt aus Kollagen A in Kollagen B oder C ein, zwei zeigten ein umgekehrtes Verhalten und die restlichen 12 wuchsen in allen Richtungen aus. In den übrigen Schalen gab es keine Bevorzugung einer Richtung. Auch hier also finden wir keinen Hinweis auf Chemotaxis in unserem "in vitro"-System.

IV. DISKUSSION

Auf fibrillären Kollagenschichten mit der Substruktur nativen Kollagens (II. 2.3.4.) und in Embryoextrakt-haltigem Medium (III. 2.3.3.) kultivierte Retinaexplantate von 5-7 Tage alten Hühnerembryonen zeigten zumindest in den ersten drei Tagen ein extensives Auswachsen von Nervenfasern. Sie wuchsen in diesem Zeitraum bis zu 3 mm weit und waren frei von mit auswachsenden Zellen. Die gute Reproduzierbarkeit des Auswachsens von Neuriten war eine Voraussetzung für die Untersuchungen an diesem "in vitro"-System, weshalb auch viel Zeit für die Optimierung der Kulturbedingungen investiert wurde. Bisher sind Untersuchungen über das Auswachsen von Neuriten vorwiegend an Nervenzellkulturen des peripheren Nervensystems verschiedener Spezies durchgeführt worden, während in Arbeiten über Retinaexplantat-Kulturen die Retinae meist von Frosch (Agranoff, 1976), Goldfisch (Landreth und Agranoff, 1976; Johns, 1978), Maus (Smalheiser, 1978) und Ratte (LaVail, 1971) stammten. Der Hauptunterschied zwischen der Retina von Fischen, die in Kultur ebenfalls ein sehr starkes Auswachsen von Neuriten zeigt, und der von höheren Wirbeltieren besteht darin, daß die Fischretina während des ganzen Lebens regenerationsfähig bleibt. Bei Retinaexplantaten von Mausembryonen wuchsen Neuriten in geringerem Maße aus als bei Retinaexplantaten von Hühnerembryonen und Fisch-Retinaexplantaten. Das könnte daran liegen, daß sich bei Hühnern durch die stammesgeschichtlich nähere Verwandtschaft zu den Fischen ein stärkeres Regenerationsvermögen der Retina erhalten hat als bei den Säugern.

Ob die in vitro auswachsenden Retinaneuriten Axone von Ganglionzellen sind, ist für die Retinaexplantate von Hühnerembryonen noch nicht eindeutig bewiesen; viele Indizien sprechen jedoch dafür: (i) in vivo wachsen nur die Axone der Ganglionzellen aus der Retina aus und über eine große Distanz von der Retina weg; (ii) die Fasern zeigen ein gerichtetes Auswachsen, das der Richtung der Ganglionzellaxone im Explantat entspricht; (iii) die Zahl der Neuriten stimmt mit der Anzahl von Fasern im optischen Nerven ungefähr überein; (iv) Zellen, die durch den retrograden Transport von Meerrettich-Peroxidase angefärbt worden sind, gehörten (wie die Ganglionzellen) zu der größten Zellklasse der Retina. Neben den Ganglionzellen enthält die Retina noch einen zweiten Typ großer Zellen, die Amakrinzellen. Leider sind die beiden Typen weder licht- noch elektronenmikroskopisch voneinander unterscheidbar. In Fisch-Retina-Explantaten, in denen die Ganglionzellschicht am längsten erhalten bleibt (Johns, 1978) konnten sie durch ihre Lage im Gewebe als Ganglionzellen identifiziert werden. Bei Retina-Explantaten des Hühnchenembryos in unseren Versuchen war dies nicht möglich, da eine Ganglionzellschicht wegen der Umlagerungen im Gewebe nach der Explantation als solche nicht mehr zu erkennen war (III. 2.1.).

Für das frühe Degenerieren der Retinaneuriten in Kultur konnte noch keine Erklärung gefunden werden. Die Degeneration trat umso eher ein, je günstiger das Medium und das Substrat waren und je schneller die Neuriten auswuchsen. Daraus könnte man schließen, daß zum Zeitpunkt der Explantation in den Ganglionzellen oder im Explantat ein begrenzter Vorrat einer Substanz vorhanden ist, der sich erschöpft. Dies scheint aber nur

für die weit auswachsenden und frei dem Medium zugewandten Fasern zu gelten; Fasern innerhalb des Zellverbands von Retinaexplantaten können noch 2 Wochen nach der Explantation durch Anfärben mit Meerrettich-Peroxidase sichtbar gemacht werden. Ein Hinweis darauf, daß auswachsende Fasern mit den Fasern im Zellverband identisch sind, ist die Übereinstimmung in der Länge und der bündelförmigen Anordnung (s.Abb.15). Die Überlebenszeit von Fasern auf Zellschichten war länger als auf Kollagen oder anderen toten Substraten. Offensichtlich fehlt den "nackten" Fasern der Schutz und die ernährende Funktion durch Gliazellen, die sie normalerweise in vivo umgeben - Funktionen, die bisher durch Veränderungen und "Verbesserungen" des Mediums nicht ersetzt werden konnten. Weiterhin bleibt unklar, ob nur die Fasern degenerieren oder auch (oder zuerst) die dazugehörenden Zellkörper.

Das Schicksal der Ganglionzellen in Explantaten läßt sich möglicherweise erst dann eindeutig verfolgen, wenn spezifische Marker (z.B. monoklonale Antikörper) für diese Zellen gefunden worden sind.

Dem Nachteil der früh einsetzenden Degeneration steht der Vorteil des raschen, reproduzierbaren Auswachsens von Neuriten gegenüber. So war es möglich, mit Wachstumskegeln angereichertes Neuritenmaterial zu sammeln und chemisch zu untersuchen (Kap. III. 3.). Weiterhin konnte der Einfluß des Mediums und der Unterlage auf das Wachstumsmuster der Neuriten studiert und die Art des Auswachsens von Neuriten aus verschiedenen Regionen der Retina (anterior-posterior) untersucht werden.

Die beobachteten Auswachsmuster lassen sich alle auf direkte Wechselwirkungen zwischen den Fasern untereinander und zwischen

Fasern und Substrat zurückführen, in der Literatur als Kontakthemmung (Dunn, 1971) und Kontaktführung (Weiss, 1961) beschrieben.

Kontakthemmung beeinflußt das Wachstumsmuster der Fasern bzw. Faserbündel, sie halten Abstand voneinander. Dieser Effekt wird vor allem bei hoher Neuritendichte deutlich (Ebendal, 1976a) und führt dazu, daß die Fasern radial von einem Explantat auswachsen. Darüber hinaus breitet sich ein Faserbündel fächerförmig aus, wenn keine Nachbarfasern den freien Raum mit beanspruchen (s. Abb. 24a). Die Kontakthemmung bewirkt möglicherweise auch, daß die Fasern die Auswachsrichtung längs zur Orientierung der Ganglionzell-Faserschicht im Explantat beibehalten, die auf die ursprüngliche Lage der optischen Fissur gerichtet war (Kap. III. 4.1.): die mehr zentralen Fasern könnten jeweils durch die mehr randständigen durch Kontakthemmung daran gehindert werden, senkrecht vom Explantat wegzuwachsen.

Unter Kontaktführung versteht man, daß sich Fasern parallel zu Längsstrukturen des Substrats ausrichten. Ihre Wirksamkeit hängt wahrscheinlich von der unterschiedlichen Affinität zwischen Nachbarfasern und zwischen Fasern und Substrat ab: je höher die Affinität zur Wachstumsunterlage, desto strenger ordnen sich die Fasern einer Vorzugsrichtung des Untergrunds an. Bei geringerer Affinität zum Substrat hingegen wird die Anzahl der Fasern pro Bündel größer,und die Ausrichtung von Substratstrukturen wirkt sich nicht so stark auf die Orientierung des Faserwachstums aus.

Kontakthemmung und Kontaktführung sind möglicherweise auf ein und denselben Mechanismus zurückzuführen, den ich als Kontaktkompetition bezeichnen möchte. Mit Kontaktkompetition wären Wechselwirkungen des Wachstumskegels mit seiner Umgebung (Nachbarfasern und Substrat bzw. Umgebung im Gewebe)gemeint,die bewirken, daß unter vielen, vorübergehend ausgebildeten Kontakten einer schließlich zur Verlängerung des Neuriten führt. Dabei spielte die räumliche Anordnung der möglichen, gleichberechtigten Kontaktstellen in der Umgebung des Wachstumskegels und eine differentielle Affinität zu verschiedenen Kontaktstellen eine Rolle, der Mechanismus wäre statistischer bzw. chemophysikalischer Natur. Gemeint ist damit Folgendes: Viele, immer wieder neu ausgebildete Fortsätze der Wachstumskegel (Filopodien und Lamellipodien) nehmen mit ihren distalen Enden Kontakt mit dem Substrat (oder Fasern) auf, ihre Ausbildung ist ungerichtet. Die Fortsätze stehen unter Spannung (Nakai, 1960; Bray, 1979), und die meisten Kontakte werden wieder aufgelöst, wobei die Ausläufer zurückgezogen werden und mit den Wachstumskegeln fusionieren. Einige Kontakte aber bleiben erhalten; dann wird das Axoskelett in Richtung auf die Verankerungspunkte verlängert. Entscheidend für die resultierende Wachstumsrichtung wäre nun die Dauer (oder Häufigkeit) der jeweils bestehenden Kontakte. Diese hängt möglicherweise von zwei Parametern ab, erstens von der räumlichen Anordnung potentieller Kontaktstellen im Substrat (hiermit wären Phänomene der Kontaktführung erklärbar) und zweitens von der chemischen Beschaffenheit des Untergrunds (Kontaktführung = Fasern folgen einer zunehmenden Affinität; Kontakthemmung = Affinität zu nachbar-Fasern geringer als zum Substrat). Dabei könnten qualitative und quantitative Unterschiede der Oberflächen, mit denen das

Axon in Berührung kommt, eine Rolle spielen. Letzteres wäre mit der Chemoaffinitätstheorie der neuronalen Spezifität von Sperry (1963) vereinbar und entspräche der Hypothese, daß die Fasern durch die differentielle Affinität zu Makromolekülen, Zellen und interzellulärer Matrix gelenkt würden.

Bis jetzt wurde versucht, die Auswachsmuster der Retinaneuriten allein auf direkte Wechselwirkungen der Fasern zum Substrat und der Fasern untereinander zurückzuführen. Könnte nicht auch ein mögliches chemotaktisches Verhalten der Fasern eine Rolle spielen? Chemotropismus würde bedeuten, daß die Fasern Gradienten diffundibler Stoffe erkennen und sich danach ausrichten könnten.

Als Erklärung dafür, daß Fasern auf einem aberranten Weg in Gewebe einwachsen und trotzdem zum richtigen Zielgebiet gelangen und korrekte Verknüpfungen machen, reicht mechanische Führung von Axonen allein nicht aus. Zum Beispiel regenerierten bei der Grille die Axone von sensorischen Neuronen der Abdominalcerci, die auf den Thorax verpflanzt worden sind, und wuchsen selektiv zu den Riesenaxonen im zentralen Nervensystem, mit denen sie normalerweise Verbindung aufnehmen (Edwards und Sahota, 1967). Beim Hummer wächst gelegentlich nach Entfernung eines Komplexauges eine heteromorphe Antenne nach. Ihre sensorischen Nerven machen nun Synapsen mit denselben Zellen wie die normalen Antennen (Maynard und Cohen, 1965). Bei Amphibien und Fischen gibt es einige Beispiele, bei denen optische Fasern, nachdem sie geschnitten und von der normalen Route abgelenkt worden sind, trotzdem zu ihren korrekten Zielorten zurückgewachsen sind (Arora und Sperry, 1962; Attardi und Sperry, 1963). Optische Nervenfasern sind sogar zum Tektum zurückgewach-

sen, nachdem sie mit dem peripheren Stumpf des okulomotorischen Nerven vereinigt worden waren (Hibbard, 1967), allerdings nur in sehr seltenen Fällen. Alle diese Beispiele haben gemeinsam, daß über eine rein mechanische Führung hinaus noch ein anderer Mechanismus für die Erklärung dieses selektiven Nervenwachstums angenommen werden muß. Dieser kann aber für jeden der genannten Befunde ein anderer sein; z.B. könnten axonale Verzweigungen gemacht werden, die mit einer Vielzahl verschiedener Zellen Kontakte aufnehmen und anschließend die "falschen" eliminiert werden und nur die korrekte überlebt (Speidel, 1935, 1941), oder die Fasern suchen mehr oder weniger statistisch, bis sie ihre "Spur" gefunden haben, auf der sie dann durch differentielle Chemoaffinität zur richtigen Stelle geleitet werden; in keinem der Fälle aber gab es eine Evidenz für einen positiven Chemotropismus.

Es sind jedoch Versuche "in vitro" beschrieben worden (Chamley, 1973; Ebendal, 1976a; Ebendal und Jacobson, 1977), die an dem möglicherweise voreiligen Schluß aus den obigen Beispielen, es gäbe überhaupt keinen Chemotropismus, zweifeln lassen könnten. In diesen Versuchen wurde eine Stimulation des axonalen Auswachsens von sympathischen Ganglien von Hühnerembryonen in Richtung auf in 0,5 bis 1 mm Entfernung ausgepflanzte Zielgewebe beobachtet. Ebendal und Jacobson (1977) beschrieben sogar eine Rangfolge des stimulativen Effektes von Colon, Herz und Leber auf das Remak's-(Colon-) Ganglion, abnehmend in der angegebenen Reihenfolge. Dieser Befund spricht dafür, daß vom Zielgewebe tropische Substanzen ausgehen, die das axonale Wachstum spezifisch stimulieren. Offen wäre aber noch die Frage, ob die Fasern den Konzentrationsgradienten dieser Faktoren im flüssigen Medium erkennen

können oder ob die Faktoren substratgebunden vorliegen müssen, um richtungsbestimmend wirksam zu sein (vgl. den stimulativen Effekt der Faktoren in Herz-konditioniertem Medium, die nur substratgebunden wirksam sind (Collins, 1978)).

Letourneau (1978) beschrieb das Verhalten der Nervenfasern isolierter Zellen aus Rückenmarksganglien von Hühnerembryonen. Sie befanden sich in einer halbfesten Agarmatrix, in der ein NGF-Gradient aufgebaut war. Das Ergebnis war, daß annähernd 60 % der Nervenenden in Richtung höherer NGF-Konzentration wuchsen.

Versuche, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Retina-Explantaten von Hühnerembryonen gemacht wurden, sprechen gegen ein chemotaktisches Verhalten dieser auswachsenden Neuriten. Es konnte keine Stimulation des Auswachsens in Richtung auf verschiedene Zielgewebe wie optisches Tektum (dem natürlichen Zielorgan), Herz, Leber oder mit Tektumextrakt gefüllte Kapillaren beobachtet werden. Außerdem hatte Nervenwachstumsfaktor weder in verschiedenen Konzentrationen im Medium noch als Gradient von Kapillaren ausgehend einen Einfluß auf das Auswachsen der Neuriten.

Vergleicht man die Ergebnisse, die einerseits an Kulturen der Retina und andererseits an Kulturen von sympathischen Ganglien (beide von Hühnerembryonen) gewonnen worden sind, so könnte das unterschiedliche chemotaktische Verhalten und die unterschiedliche Antwort auf Nervenwachstumsfaktor auf die verschiedene Herkunft der Nervengewebe zurückzuführen sein, nämlich einerseits vom zentralen Nervensystem und andererseits vom peripheren Nervensystem.

Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene "in vitro"-System könnte als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen und zum Verständnis der Mechanismen beitragen, die der Entstehung eines neuronalen Netzwerks zugrunde liegen. Dabei bieten sich z.B. elektrophysiologischen Untersuchungen der Kontaktaufnahme von Fasern mit verschiedenen Zielzellen an. Besonders interessant und vielversprechend erscheinen mir auch Versuche, die sich mit den morphologischen, physiologischen und biochemischen Unterschieden zwischen anterioren und posterioren Fasern befassen; die bereits gefundenen Unterschiede zeigen ja eine scharfe Grenze zwischen den beiden Retina-Arealen. Dahinter verbirgt sich möglicherweise ein Mechanismus, der bei den Wechselwirkungen zwischen Axonen in vivo eine wichtige Rolle spielt.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es werden Kulturbedingungen beschrieben, unter welchen Nervenfortsätze der embryonalen Hühnchenretina auswachsen. Sie erreichen eine Länge von 2 bis 5 Millimeter und sind frei von mitauswachsenden Zellen. Mehrere Beobachtungen sprechen dafür, daß diese Fasern Axone von Ganglionzellen sind.

Die Retinaneuriten behalten beim Auswachsen aus Explantatkulturen von Streifen durch die ganze Retina ihre Orientierung, die sie im Gewebe hatten, über eine Distanz von zwei Millimetern in der Kulturschale bei. Dabei gibt es morphologische Unterschiede zwischen anterioren und posterioren Fasernbündeln. Außerdem wird das Wachstumsmuster durch die Beschaffenheit des Substrats, die Zusammensetzung des Mediums und die Dichte des Auswachsens beeinflußt. Die Retinaneuriten richten ihr Wachstum einerseits streng nach Strukturen der Wachstumsunterlage aus (Kontaktführung) und modifizieren sie andererseits durch Wechselwirkungen untereinander (Kontakthemmung). Es wird diskutiert, ob diese beiden richtungsweisenden Parameter auf ein und denselben Mechanismus zurückzuführen sein könnten.

Ein chemotaktisches Verhalten der Neuriten aus Explantaten der embryonalen Hühnchenretina konnte nicht nachgewiesen werden. Außerdem gab es keinen Hinweis darauf, daß die Fasern in vitro noch Teile ihres prospektiven Zielgewebes, des optischen Tektums, erkennen können.

Die mit Wachstumskegeln angereicherten Enden der Neuriten unterscheiden sich im Proteinmuster von der Präparation, die die Zellkörper enthält.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Adams, J.C.: Technical considerations on the use of HRP as a neuronal marker. Neuroscience 2, 141-145 (1977)

Agranoff, B.W., P.Field and R.M. Gaze: Neurite outgrowth from explanted Xenopus retina: an effect of prior optic nerve section. Brain Res.113, 225-234 (1976)

Anderson, P.J.: Purification and quantitation of glutaraldehyde and its effects on several enzyme activities in skeletal muscle. J.Histochem.Cytochem. 15, 652-661 (1967)

Arora, H.L., and R.W. Sperry: Optic nerve regeneration after surgical cross-union of medial and lateral optic tracts. Am.Zool. 2, 61 (1962)

Attardi, D.G., and R.W. Sperry: Preferential selection of central pathways by regenerating optic fibres. Exp.Neurol. 7, 46-64 (1963)

Barbera, A.J.: Adhesive recognition between developing retinal cells and optic tecta of the chick embryo. Dev.Biol.46, 167-191 (1975)

Barbera, A.J., R.B.Marchase and S.Roth: Adhesive recognition and retinotectal specificity. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 70, 2482-2486 (1973)

Bonhoeffer, F., and J.Huf: Recognition of cell types by axonal growth cones in vitro. Nature 288, 162-164 (1980)

Bornstein, M.B.: Reconstituted rat-tail collagen used as substrate for tissue culture on coverslips in Maximow slides and roller tubes. Lab.Invest. 7, 134-137 (1958)

Bray, D.: Mechanical tension produced by nerve cells in tissue culture. J.Cell Sci. 37, 391-410 (1979)

Campenot, R.B.: Local control of neurite development by nerve growth factor. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 74, 4516-4519 (1977)

Chamley, J.H., I.Goller and G. Burnstock: Selective growth of sympathetic nerve fibers to explants of normally densely innervated autonomic effector organs in tissue culture. Dev.Biol. 31, 362-379 (1973)

Clarke, P.G.H., and D. Whitteridge: Projection of retina, including red area on to optic tectum of pigeon. Quart.J.Exp. Physiol. 61, 351 (1976)

Claviez, M.: Vergleich verschiedener Präparationsmethoden zur Oberflächendarstellung von RNS-Tumorviren und der sie produzierenden Zellen im Transmissions- und Raster-Elektronenmikroskop. Diplomarbeit, Tübingen 1976

Collins, F.: Induction of neurite outgrowth by a conditioned medium factor bound to the culture substratum. Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A. 75, 5210-5213 (1978)

Cook, J.E.: Interactions between optic fibres controlling the locations of their terminals in the goldfish optic tectum. J.Embryol.exp.Morph. 52, 89-103 (1979)

Cook, J.E., and T.J.Horder: Interactions between optic fibres in their regeneration to specific sites in the goldfish tectum. J.Physiol. (London) 241, 89-90P (1974)

Coulombre, A.J.: Correlations of structural and biochemical changes in the developing retina of the chick. Amer.J. Anatomy 96, 153- 189 (1955)

Crick, F.H.C.: The scale of pattern formation. Symp.Soc.Exp.Biol. 25, 429-438 (1971)

Crossland, W.J., W.M.Cowan, L.A.Rogers, and J.P.Kelly: The specification of the retino-tectal projection in the chick. J.Comp.Neurol. 155, 127-164 (1974)

Deitch, A.D., and G.C.Goodman: Modification of plastic culture dishes for high-resolution microscopy of living cells. Stain Technology 41, 19-22 (1966)

Dubochet, J., M.Ducommun, M.Zollinger and E.Kellenberger: A new preparation method for dark-field electron microscopy of biomacromolecules. J.Ultrastr.Res. 35, 147-167 (1971)

Dulbecco, R., and G. Freeman: Plaque production by the polyoma virus. Virology 8, 396-397 (1959)

Dunn, G.A.: Mutual contact inhibition of extension of chick sensory nerve fibres in vitro. J.Comp.Neur. 143, 491-508 (1971)

Ebendal, T.: The relative roles of contact inhibition and contact guidance in orientation of axons extending on aligned collagen fibrils in vitro. Exp.Cell Res. 98, 259-169 (1976a)

Ebendal, T.: Experiments in vitro on neuron development and axon orientation in the chick embryo. Doctoral thesis, Uppsala University, Sweden (1976b)

Ebendal, T., and C.-O.Jacobson: Tissue explants affecting extension and orientation of axons in cultured chick embryo ganglia. Exp.Cell Res. 105, 379-387 (1977)

Edwards, J.S., and T.S. Sahota: Regeneration of a sensory system: The formation of central connections by normal and transplanted cerci of the house cricket Acheta domesticus. J.Exp.Zool. 166, 387-396 (1967)

Elsdale, T., and J.Bard: Collagen substrata for studies on cell behavior. J.Cell Biol. 54, 626-637 (1972)

Fawcett, J.: Fibre organization in the optic nerve of Xenopus laevis. J.Physiol. 306, 32P (1980)

Forssman, J.: Über die Ursachen, welche die Wachstumsrichtung der peripheren Nervenfasern bei der Regeneration bestimmen. (Ziegler's)Beitr.Pathol.Anat.Allgem.Pathol. 24, 56-100 (1898)

Forssman, J.: Zur Kenntnis des Neurotropismus. (Ziegler's) Beitr.Pathol.Anat.Allgem.Pathol. 27, 407-430 (1900)

Frazier, W., and L.Glaser: Surface components and cell recognition. Ann.Rev.Biochem. 48, 491-523 (1979)

Fujisawa, H., K.Watanabe, N.Tani and Y.Ibata: Retinotopic analysis of fiber pathways in amphibians. II. The frog Rana nigromaculata. Brain Res. 206, 21-26 (1981)

Gaze, R.M., and S.C. Sharma: Axial differences in the reinnervation of the goldfish optic tectum by regenerating optic nerve fibres. Exp.Brain Res. 10, 171-181 (1970)

Gillet, R., and K.Gull: Glutaraldehyde - its purity and stability. Histochemie 30, 162-167 (1972)

Gottlieb, D.I., and C. Arington: Patterns of adhesive specificity in the developing central nervous system of the chick. Devel.Biol. 71, 260-273 (1979)

Gottlieb, D.I., K.Rock and L.Glaser: A gradient of adhesive specificity in developing avian retina. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 73, 410-414 (1976)

Hamburger, V., and H.Hamilton: A series of normal stages in the development of the chick embryo. J.Morphol. 88, 49-92 (1951)

Harrison, R.G.: On the sterotropism of embryonic cells. Science 34, 279 (1911)

Harrison, R.G.: The cultivation of tissues in extraneous media as a method of morphogenetic study. Anat.Rec. 6, 181-193 (1912)

Hausman, R.E., and A.A. Moscona: Isolation of retina-specific cell-aggregating factor from membranes of embryonic neural retina tissue. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 73, 3594-3598 (1976)

Hibbard, E.: Visual recovery following regeneration of the optic nerve through the oculomotor nerve root in Xenopus. Exp.Neurol. 19, 350-356 (1967)

His, W.: Über mechanische Grundvorgänge tierischer Formenbildung. Arch.Anat.Physiol.Leipzig Anat.Abt.1-80 (1894)

Horder, T.J.: Retention by fish optic nerve fibers regenerating to new terminal sites in the tectum, of 'chemospecific' affinity for their original sites. J.Physiol. Lond.216, 53-55 (1971)

Horder, T.J., and K.A.C. Martin: Morphogenetics as an alternative to chemospecificity in the formation of nerve connections. Soc.Exp.Biol. Symp. 32, 275-358, Cambridge University press, 1978

Horton, J.C., M.M. Greenwood and D.H.Hubel: Non-retinotopic arrangement of fibres in cat optic nerve. Nature 282, 720-722 (1979)

Jacobson, M.: Studies in the organization of visual mechanisms in amphibians. Ph.D.thesis, Edinburgh University, 1960

Jacobson, M., and R.L.Levine: Plasticity in the adult frog brain: Filling the visual scotoma after excision or translocation of parts of the optic tectum. Brain Res. 88, 339-345 (1975)

Johns, P.R., A.M. Heacock and B.W.Agranoff: Neurites in explant cultures of adult goldfish retina derived from ganglion cells. Brain Res. 142, 531-537 (1978)

Kahn, A.J.: An autoradiographic analysis of the time of appearance of neurons in the developing chick neural retina. Dev.Biol. 38, 30-40 (1974)

Karnovsky, M.J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J.Cell Biol. 27, 137a (1965)

Landreth, G.E., and B.W.Agranoff: Explant culture of adult goldfish retina: effect of prior optic nerve crush. Brain Res. 113, 299-303 (1976)

LaVail, J.H., and M.M.LaVail: The retrograde intraaxonal transport of horseradish peroxidase in the chick visual system: A light and electron microscopic study. J.Comp.Neurol. 157, 303-358 (1974)

LaVail, M., and W. Hild: Histotypic organization of the rat retina in vitro. Z.Zellforsch. 114, 557-579 (1971)

Letourneau, P.C.: Possible roles for cell-to-substratum adhesion in neuronal morphogenesis. Dev.Biol. 44, 77-91 (1975a)

Letourneau, P.C.: Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation. Dev.Biol. 44, 92-101 (1975b)

Letourneau, P.C.: Chemotactic response of nerve fiber elongation to nerve growth factor. Dev.Biol. 66, 183-196 (1978)

Levine, R., and M.Jacobson: Deployment of optic nerve fibers is determined by positional markers in the frog's tectum. Exp.Neurol. 43, 527-538 (1974)

Loeb, L.: Über das Wachstum des Epithels. Arch.Entw.-Mech.Organ. 13, 487-506 (1902)

Marchase, R.B., A.J.Barbera and S. Roth: A molecular approach to retinotectal specificity. Ciba Found.Symp. 29, 315-341 (1975)

Maynard, D.M., and M.J. Cohen: The function of a heteromorph antennule in a spiny lobster, Panulirus argus. J.Exp.Biol. 43, 55-78 (1965)

McGill, J.I., T.P.S. Powell and W.M. Cowan: Retinal representation upon optic tectum and isthmo-optic nucleus in pigeon. J.Anat. 100, 5 (1966)

McIlwain, H., and H.L.Buddle: Techniques in tissue metabolism. 1. A mechanical chopper. Biochem.J. 53, 412 (1953)

McKanna, J.A. and T. Lempka: Short technical note: Phase separation in alcohol liquid carbon dioxide solvent systems facilitates critical point drying. J.Microscopy 118, 237-240 (1979)

Mesulam, M.M.: The blue reaction product in horseradish peroxidase neurohistochemistry: Incubation parameters and visibility. J.Histochem.Cytochem. 24, 1273-1281 (1976)

Morgan, J.I., and W.Seifert: Growth factors and gangliosides: A possible new perspective in neuronal growth control. J.Supramol.Struct. 10, 111-124 (1979)

Nakai, J.: Studies on the mechanism determining the course of nerve fibres in tissue culture. II. The mechanism of fasciculation. Z.Zellforsch.Mikrosk.Anat. 52, 427-449 (1960)

Neukirchen, R.: Gel-Elektrophorese im Mikromaßstab: Entwicklung und praktische Anwendung von ein- und zweidimensionaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Trennung von Proteinen im Nanogrammbereich. Dissertation, Tübingen 1980

Paul, J.: Zell- und Gewebekulturen / John Paul. Übers. u. bearb. von S.u.R.Maurer. Berlin, New York: De Gruyter, 1979 (Erstauflage E.& S. Livingstone Ltd. Edinburgh and London, 1959)

Rager, G., u. U.Rager: Generation and degeneration of retinal ganglion cells in the chicken. Exp.Brain Res. 25, 551-553 (1976)

Rager, G.: Specificity of nerve connections by unspecific mechanisms? Trends in NeuroSciences, 43-44, Feb.1980a

Rager, G.: Die Ontogenese der retinotopen Projektion. Naturwissensch. 67, 280-287 (1980)

Ramón y Cajal, S.: Algunas observaciones favorables á la hipótesis neurotropica. Trabajos Lab.Invest.Biol.Univ. Madrid 8, 63-134 (1910)

Ramón y Cajal, S.: Degeneration and Regeneration of the Nervous System (R.M. May, trans.), Hafner, New York, 1959

Rappaport, C.: Studies on properties of surfaces required for growth of mammalian cells in synthetic medium. II. The monkey kidney cells. Exp.Cell Res. 20, 479 (1960)

Reissig, M., and S.A.Orrell: A technique for the electron microscopy of protein-free particle suspensions by the negative staining method. J.Ultrastr.Res. 32, 107-117 (1970)

Scalia, F., and K.Fite: A retinotopic analysis of the central connections of the optic nerve in the frog. J.Comp.Neur. 158, 455-478 (1974)

Scholes, J.H.: Nerve fibre topographs in the retinal projection to the tectum. Nature 278, 620-624 (1979)

Scott, B.S.: The effect of elevated potassium on the time course of neuron survival in cultures of dissociated dorsal root ganglia. J.Cell Physiol. 91, 305-316 (1977)

Sharma, S.C.: Restoration of the visual projection following tectal lesions in goldfish. Exp.Neurol. 35, 358-365 (1972)

Sharma, S.C., and R.M. Gaze: The retinotopic organization of visual responses from tectal reimplants in adult goldfish. Arch.Ital.Biol. 109, 357-366 (1971)

Silver, P.H.S., and J.Wakely: Fine structure, origin and fate of extracellular material in the interspace between the presumptive lens and presumptive retina of the chick embryo. J.Anat. 118, 19-31 (1974)

Smalheiser, N.R., and S.M.Crain: Formation of functional retinotectal connections in co-cultures of fetal mous explants. Brain Res. 148, 484-492 (1978)

Speidel, C.C.: Studies on living nerves. III. Phenomena of nerve irritation, recovery, degeneration and repair. J.Comp.Neurol. 61, 1-82 (1935)

Speidel, C.C.: Adjustments of nerve endings. Harvey Lect. 36, 126-158 (1941)

Sperry, R.W.: Visuomotor coordination in the newt (Triturus viridescens) after regeneration of the optic nerves. J.Comp. Neurol. 79, 33-55 (1943)

Sperry, R.W.: Optic nerve regeneration with return of vision in anurans. J.Neurophysiol. 7, 57-69 (1944)

Sperry, R.W.: Neuronal specificity, pp. 232-239. In: Genetic Neurology (P.Weiss, ed.), University of Chicago Press, Chicago 1950

Sperry, R.W.: Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 50, 703-710 (1963)

Thiery, J.-P., R.Brackenbury, U. Rutishauser and G.M.Edelman: Adhesion among neural cells of the chick embryo. J.Biol.Chem. 252, 6841-6845 (1977)

Udin, S.B.: Retinotectal plasticity after half-tectum ablation in adult frogs. Neurosci.Abstr. 1, 799 (1975)

Udin, S.B.: Progressive alterations in optic tract and retinotectal topography during optic nerve regeneration in Rana pipiens. Neurosci.Abstr. II/(2), 1213 (1976)

Venable, J.H., and R. Coggeshall: Simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. J.Cell Biol. 25, 407-408 (1965)

Weiss, P.: Erzwingung elementarer Strukturverschiedenheiten am in vitro wachsenden Gewebe. Arch.Entw.-Mech.Organ. 116, 438-554 (1929)

Weiss, P.: Nerve patterns: The mechanics of nerve growth. Third Growth Symp. 5, 163-203 (1941)

Weiss, P.: Nerves system, pp. 346-401. In: Analysis of Development (B.H.Willier, P.Weiss, and V.Hamburger, eds.) Saunders, Philadelphia, 1955

Weiss, P.: Guiding principles in cell locomotion and cell aggregation. Exp.Cell Res., Suppl.8, 260-281 (1961)

Willshaw, D.: Can the specificity of some nerve connections be accounted for by unspecific mechanisms? Trends in NeuroScience 157-159, June 1980

Yoon, M.G.: Reorganization of retinotectal projection following surgical operations on the optic tectum in goldfish. Exp. Neurol. 33, 395-411 (1971)

Yoon, M.G.: Reversibility of the reorganization of retinotectal projection in goldfish. Exp.Neurol. 35, 565-577 (1972)

Yoon, M.G.: Induction of compression in the re-established visual projections on to a rotated tectal reimplant that retinas its original topographic polarity within the halved optic tectum of adult goldfish. J.Physiol. 264, 379-410 (1977)

L E B E N S L A U F

Am 12. Januar 1946 wurde ich, Michael Claviez, als Sohn des Schiffbauingenieurs Wolfram Claviez und seiner Ehefrau Eva Claviez, geb. Drost, in Kappeln (Kreis Schleswig) geboren. Von 1948 bis 1952 wohnten wir in Stuttgart und lebten seitdem in Tübingen. 1954 bis 1957 besuchte ich die Dorfackerschule in Tübingen-Lustnau, dann das Uhland-Gymnasium in Tübingen, an dem ich im März 1966 das Abitur bestand.

Von April 1966 bis Oktober 1967 leistete ich den Wehrdienst bei der Marine und wurde nach einer Wehrübung 1970 zum Leutnant zur See d.R. ernannt.

Seit Oktober 1967 studierte ich an der Universität Tübingen das Fach Biologie, in dem ich 1970 die Vordiplomprüfung und 1974 die Diplomprüfung mit dem Hauptfach Genetik ablegte. Die Diplomarbeit führte ich 1974 bis 1976 am Max-Planck-Institut für Virusforschung unter Anleitung von Prof. Dr. W. Schäfer und Dr. H. Frank über die Oberflächendarstellung von RNS-Tumorviren-produzierenden Zellen durch. Von Mai 1976 bis Februar 1981 arbeitete ich an meiner Dissertation am selben Institut unter Anleitung von Dr. U. Schwarz.

Meine akademischen Lehrer waren:

F. Bonhoeffer	M. Krüger	E. Sander
E. Bünning	R. Lorenz	R. Schönenberg
D. Dütting	K. Mägdefrau	V. Schwartz
A. Eisenack	G. Mickoleit	W. Schweizer
H. Frank	F.P. Möhres	B. Schwemmle
A. Gierer	E. Müller	W. Seyffert
K.G. Grell	G. Neuweiler	K. Wöhrmann
P. Hausen	W. Rüdorff	